

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年3月28日 (28.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/24923 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/55, 9/16, 5/10, 1/21, C12Q 1/68, C07K 16/40, G01N 33/573, 33/50, 33/15, A61K 38/46, 31/711, 39/395, A61P 11/06, 9/10, 19/02, 39/00, 7/00, 17/00, 25/16, 5/38, 25/28, 35/00, 13/12

[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/08138

(22) 国際出願日: 2001年9月19日 (19.09.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2000-284044 2000年9月19日 (19.09.2000) JP

特願2001-146466 2001年5月16日 (16.05.2001) JP

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 宮地宏昌 (MIYAJI, Hiromasa) [JP/JP]; 春岡素子 (HARUOKA, Motoko) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 永田裕之 (NAGATA, Hiroyuki) [JP/JP]. 太田紀夫 (OTA, Toshio) [JP/JP]. 川端彩子 (KAWABATA, Ayako) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 菅野純夫 (SUGANO, Sumio) [JP/JP]; 〒167-0052 東京都杉並区南荻窪4-8-13 Tokyo (JP). 中村祐輔 (NAKAMURA, Yusuke) [JP/JP]; 〒225-0011 神奈川県横浜市青葉区あざみ野1-17-33 Kanagawa (JP).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

[続葉有]

(54) Title: POLYPEPTIDE HAVING PHOSPHOLIPASE A₂ ACTIVITY

(54) 発明の名称: ホスホリバーゼA₂活性を有するポリペプチド

(57) Abstract: A novel phospholipase A₂ polypeptide; DNA encoding this polypeptide; a vector containing this DNA; a transformant transformed by this vector; and a process for producing the above phospholipase A₂ polypeptide. Methods of using the above polypeptide, for example, a method of screening a compound having an agonist or antagonist activity by using this polypeptide or an antibody thereto; and drugs containing this polypeptide or its antibody. A polypeptide (hereinafter referred to simply as the inhibitory polypeptide) inhibiting the phospholipase A₂ activity of the phospholipase A₂ polypeptide; DNA encoding the inhibitory polypeptide; a vector containing the DNA encoding the inhibitory polypeptide; a transformant transformed by this vector; drugs containing this inhibitory polypeptide; and a process for producing the inhibitory polypeptide.

(57) 要約:

本発明は、新規ホスホリバーゼA₂ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該ホスホリバーゼA₂ポリペプチドの製造方法に関する。本発明はまた、該ポリペプチドの利用方法、例えば、該ポリペプチドまたはその抗体を用いたアゴニストまたはアンタゴニスト活性を有する化合物のスクリーニング方法、並びに該ポリペプチドまたはその抗体を含む医薬に関する。さらに本発明は、ホスホリバーゼA₂ポリペプチドのホスホリバーゼA₂活性を阻害するポリペプチド(以下、阻害ポリペプチドと略す)、該阻害ポリペプチドをコードするDNA、該阻害ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、該阻害ポリペプチドを含む医薬、および該阻害ポリペプチドの製造方法に関する。

WO 02/24923 A1



DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。

明細書

ホスホリパーゼA₂活性を有するポリペプチド

技術分野

本発明は、新規ホスホリパーゼA₂ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該ホスホリパーゼA₂ポリペプチドの製造方法に関する。本発明はまた、該ポリペプチドの利用方法、例えば、該ポリペプチドまたはその抗体を用いたアゴニストまたはアンタゴニスト活性を有する化合物のスクリーニング方法、並びに該ポリペプチドまたはその抗体を含む医薬に関する。さらに本発明は、ホスホリパーゼA₂ポリペプチドのホスホリパーゼA₂活性を阻害するポリペプチド（以下、阻害ポリペプチドと略すこともある）、該阻害ポリペプチドをコードするDNA、該阻害ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、該阻害ポリペプチドを含む医薬、および該阻害ポリペプチドの製造方法に関する。

背景技術

ホスホリパーゼは生体膜成分であるグリセロリン脂質のエステル結合を加水分解する酵素の総称であり、加水分解の位置によりホスホリパーゼA₁、ホスホリパーゼA₂、ホスホリパーゼB、ホスホリパーゼC、およびホスホリパーゼDに分類される。

ホスホリパーゼA₂はグリセロリン脂質のsn-2位のエステル結合を加水分解し、脂肪酸とリゾリン脂質を生成する。遊離された脂肪酸のうち、アラキドン酸はシクロオキシゲナーゼおよび5-リポキシゲナーゼを介してそれぞれプロスタグランジンおよびロイコトリエンに代謝される。またリゾリン脂質も血小板活性化因子に代謝される。

すなわち、ホスホリパーゼA₂はこれら脂質メディエイターの生成開始酵素と位置付けられる。シクロオキシゲナーゼおよび5-リポキシゲナーゼの阻害薬は抗炎症薬としてすでに臨床的に用いられていることから、その上流に位置するホスホリパーゼA₂の阻害薬はこれらの生成を同時に遮断する強力な抗炎症薬になることが期待される。

ホスホリパーゼA₂は、構造および性質から、分泌型ホスホリパーゼA₂、細胞質ホスホリパーゼA₂、およびCa²⁺非依存的ホスホリパーゼA₂の主に3つのサブファミリーに大別される[J. Biol. Chem., 269, 13057 (1994)]。

細胞質ホスホリパーゼA₂にはα、β、およびγの3つのサブタイプがす

でに知られている。細胞質ホスホリパーゼA₂α、A₂β、およびA₂γはそれぞれ分子量85キロダルトン、110キロダルトン、および60キロダルトンの酵素であり、いずれもほとんどの組織で普遍的に発現している。細胞質ホスホリパーゼA₂αの200番目のアルギニン、228番目のセリン、および549番目のアスパラギン酸は活性に必須であり[J. Biol. Chem., 271, 19225 (1996)]、細胞質ホスホリパーゼA₂βおよびA₂γにも保存されている。

細胞質ホスホリパーゼA₂αおよびA₂βは、N末端側にC2ドメインを持ち、本ドメインを介してCa²⁺依存的にリン脂質膜に結合する。細胞質ホスホリパーゼA₂γはC2ドメインを持っていない[J. Biol. Chem., 273, 21926 (1998)、J. Biol. Chem., 274, 8823 (1999)、J. Biol. Chem., 274, 17063 (1999)]。

細胞質ホスホリパーゼA₂αは、刺激による脂質メディエイター生成に関与していると考えられる[J. Biol. Chem., 272, 16709 (1997)]。細胞質ホスホリパーゼA₂βおよびA₂γの生理的機能はまだ分かっていない。

炎症やアレルギー等の脂質メディエイターの産生が発症および病態の進展に関与している可能性のある疾患を予防あるいは治療するために、その疾患に関するホスホリパーゼA₂サブタイプに特異的な阻害薬が求められている。

逆に、脾臓ではホスホリパーゼA₂はインスリン分泌促進に働くとの報告があり[Biochimica et Biophysica Acta, 1390, 301, (1998)、Biochemical Society Transactions, 25, 213S (1997)、Biochemical Pharmacology, 53, 1077 (1997)]、ホスホリパーゼA₂活性を向上させることにより糖尿病の予防や治療を行うことができる可能性がある。

ホスホリパーゼA₂活性を阻害する場合または向上させる場合のいずれの場合においても、非選択的な薬物は目的としない組織および細胞におけるリン脂質の代謝への影響が問題になるので望ましくない。

しかし、細胞質ホスホリパーゼA₂α、βおよびγの発現はすべて普遍的であり、組織あるいは細胞特異的な細胞質ホスホリパーゼA₂は従来知られていない。

したがって、本目的を達成するためには、特定の疾患に関するホスホリパーゼA₂を同定し、単離しなければならない。

細胞質ホスホリパーゼA₂の場合、該酵素の存在量が極微量であることから、組織あるいは細胞からの該酵素の精製および単離は容易ではない。古典的な酵素学的手法を用いた新規なサブタイプの単離は、現在用いられている精製法の限界および单一の精製酵素標品が得られたことを確認することの困難さにより阻まれている。

そこで、組織あるいは細胞特異的な新規ホスホリパーゼサブタイプを見出し、該ホスホリパーゼサブタイプを組換えDNA技術を用いて大量に調製することができれば、該ホスホリパーゼサブタイプを用いてより特異的かつ安全な阻害薬の開発が可能になることが期待される。

発明の開示

本発明は、新規ホスホリパーゼA₂ポリペプチドおよび該ホスホリパーゼA₂ポリペプチドをコードするDNAを提供することを目的とする。

本発明はまた、該ホスホリパーゼA₂ポリペプチド、該ホスホリパーゼA₂ポリペプチド活性を阻害するポリペプチドまたは該ホスホリパーゼA₂ポリペプチドを認識する抗体などをを利用して、喘息、虚血性疾患、関節炎、リウマチ、敗血症、皮膚の炎症、動脈硬化、痛み、パーキンソン氏病、アルツハイマー病、悪性腫瘍、腎炎、糖尿病または虚血再灌流障害の診断、予防または治療のための医薬を提供することを目的とする。

本発明者らは、ヒト小腸からcDNAライブラリーを調製しランダムに塩基配列の解析を行った。得られた塩基配列に対して、blastサーチ(BLAST SEARCH)相同性検索ソフトウェアを用いて解析し、ヒト細胞質ホスホリパーゼA₂β(GenBank: AAC78836)のC2ドメインと相同性の認められる配列を見出した。該クローンの全塩基配列を決定し、該塩基配列を基にヒト腎cDNAライブラリーから細胞質ホスホリパーゼA₂との相同領域を触媒ドメインも含めて完全に含むcDNAをクローン化した。該クローンの全塩基配列を決定し解析することにより本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下の(1)～(5)の発明に関する。

(1) 配列番号1、22、26および38記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(2) 配列番号1、22、26および38記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホリパーゼA₂活性を有するポリペプチド。

(3) 配列番号1、22、26および38記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつホスホリパーゼA₂活性を有するポリペプチド。

(4) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドをコードするDNA。

(5) 配列番号2、23、27および39記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNA。

(6) 配列番号2、23、27および39記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつホスホリパーゼA₂活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(7) 上記(4)～(6)いずれか1つのDNAを含む組換えベクター。

(8) 上記(7)の組換えベクターを保有する形質転換体。

(9) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞からなる群から選ばれる形質転換体である、上記(8)の形質転換体。

(10) 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、上記(9)の形質転換体。

(11) 微生物が、Escherichia coli JM109/p5269+C5(FERM BP-7281)である、上記(9)の形質転換体。

(12) 上記(8)～(11)いずれか1つの形質転換体を培地に培養し、培養物中にホスホリパーゼA₂活性を有するポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、ホスホリパーゼA₂活性を有するポリペプチドの製造方法。

(13) 上記(4)～(6)いずれか1つのDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するセンスオリゴヌクレオチド、該センスオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびこれらセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体からなる群から選ばれるオリゴヌクレオチド。

(14) 配列番号13、14、28、29、30、31、46および47記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

(15) オリゴヌクレオチド誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'ーP5'ホスホアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxyazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、

D N A 中のリボースが 2' - O - プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが 2' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体からなる群から選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、上記(13)のオリゴヌクレオチド。

(16) 上記(13)～(15)いずれか1つのオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法。

(17) 上記(13)～(15)いずれか1つのオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドの発現を抑制する方法。

(18) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドを認識する抗体。

(19) 上記(18)の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドの免疫学的検出法。

(20) 上記(18)の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドの免疫組織染色法。

(21) 上記(18)の抗体を含有する免疫組織染色剤。

(22) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドと被験試料とを接触させ、該ポリペプチドの有するホスホリバーゼA₂活性を測定することを特徴とする、該ポリペプチドの有するホスホリバーゼA₂活性を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(23) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、該ポリペプチドの発現量を検出することを特徴とする、該ポリペプチドの発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(24) 該ポリペプチドの発現量の検出が、上記(16)の方法を用いる上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドをコードするmRNAの検出である、上記(23)のスクリーニング方法。

(25) 該ポリペプチドの発現量の検出が、上記(19)の方法を用いるポリペプチドの検出である、上記(23)のスクリーニング方法。

(26) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドの有するホスホリバーゼA₂活性の変動が、該ポリペプチドの有するホスホリバーゼA₂活性の向上である、上記(22)のスクリーニング方法。

(27) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドの有するホスホリバーゼA₂活性の変動が、該ポリペプチドの有するホスホリバーゼA₂活性の減少である、上記(22)のスクリーニング方法。

(28) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドの発現の変動が、該ポリペプチドの発現量の向上である、上記(23)～(25)いずれか1つのスクリーニング方法。

(29) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドの発現の変動が、該ポリペプチドの発現量の減少である、上記(23)～(25)いずれか1つのスクリーニング方法。

(30) 上記(22)～(29)いずれか1つの方法により得られる化合物。

(31) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドをコードするDNAの転写を制御するプロモーターDNA。

(32) 上記(31)のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドをコードするDNAの転写効率を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(33) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子からなる群から選ばれる遺伝子である、上記(32)のスクリーニング方法。

(34) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドをコードするDNAの転写効率の変動が、該DNAの転写効率の向上である、上記(32)または(33)の方法。

(35) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドをコードするDNAの転写効率の変動が、該DNAの転写効率の減少である、上記(32)または(33)の方法。

(36) 上記(32)～(35)の方法により得られる化合物。

(37) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドが有するアミノ酸配列において、該ポリペプチド活性ドメイン部位の一部または全部のアミノ酸配列を欠失したポリペプチド。

(38) 配列番号3記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(39) 配列番号3記載のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホリバーゼA₂活性を阻害する活性を有するポリペプチド。

(40) 配列番号3記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつホスホリバーゼA₂活性を阻害する活性を

有するポリペプチド。

(41) 上記(37)～(40)いずれか1つのポリペプチドをコードするDNA。

(42) 配列番号4記載の塩基配列を有するDNA。

(43) 配列番号4記載の塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジエントな条件下ハイブリダイズするDNAであり、かつホスホリバーゼA₂活性を阻害する活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(44) 上記(41)～(43)いずれか1つのDNAを含む組換えベクター。

(45) 上記(44)の組換えベクターを保有する形質転換体。

(46) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞からなる群から選ばれる形質転換体である、上記(45)の形質転換体。

(47) 上記(45)または(46)の形質転換体を培地に培養し、培養物中にホスホリバーゼA₂活性を阻害する活性を有するポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、ホスホリバーゼA₂活性を阻害する活性を有するポリペプチドの製造方法。

(48) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドのホスホリバーゼA₂活性を変動させる化合物を有効成分とする、該ポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

(49) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドを有効成分として含有する、該ポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

(50) 上記(4)～(6)いずれか1つのDNAを有効成分として含有する、上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

(51) 上記(37)～(40)いずれか1つのポリペプチドを有効成分として含有する、上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

(52) 上記(41)～(43)いずれか1つのDNAを有効成分として含有する、上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

(53) 上記(13)～(15)いずれか1つのオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する、上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

(54) 上記(18)の抗体を有効成分として含有する、上記(1)

～(3) いずれか1つのポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

(55) 上記(30)または(36)の化合物を有効成分として含有する、上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

(56) 該ポリペプチドが関与する疾患が、喘息、虚血性疾患、関節炎、リウマチ、敗血症、皮膚の炎症、動脈硬化、痛み、パーキンソン氏病、アルツハイマー病、悪性腫瘍、腎炎、糖尿病または虚血再灌流障害である、上記(48)～(55)いずれか1つの医薬。

(57) 上記(28)または(34)の方法により得られる化合物を有効成分として含有する、糖尿病の診断、予防または治療のための医薬。

本発明のポリペプチドとしては、配列番号1、22、26および38記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドがあげられる。

配列番号1、22、26および38記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホリバーゼA₂活性を有するポリペプチド、または配列番号1、22、26および38記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつホスホリバーゼA₂活性を有するポリペプチドも、本発明のポリペプチドに包含される。

配列番号1、22、26および38記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホリバーゼA₂活性を有するポリペプチドおよび配列番号1、22、26および38記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつホスホリバーゼA₂活性を有するポリペプチドは、

Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)(以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコル・イン・モレキュラ・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、国際公開WO85/00817号、及びNature, 316, 601 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、

配列番号1、22、26および38記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、1個から数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

また、本発明のポリペプチドがホスホリバーゼA₂活性を有するためには、配列番号1、22、26および38記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列との相同性はBLAST〔J. Mol. Biol., 215, 403(1990)〕やFASTA〔Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)〕等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上である。

さらに、該ポリペプチドがホスホリバーゼA₂α活性を有するためには、細胞質ホスホリバーゼA₂αにおいて活性に必須であるとされる、200番目のアルギニン、228番目のセリン、および549番目のアスパラギン酸に相当するアミノ酸残基は保存されていることが望ましい。

ただし、本発明のポリペプチドには、公知のポリペプチドは含まれない。

本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略す）は、上記本発明のポリペプチドをコードするDNAであれば、どのような塩基配列を有していてもよい。該本発明のDNAとしては、例えば、配列番号2、23、27および39記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有するDNAがあげられる。

また、配列番号2、23、27および39記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつホスホリバーゼA₂活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAも本発明のDNAに包含される。

上記の「配列番号2、23、27および39記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつホスホリバーゼA₂活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA」とは、配列番号2、23、27および39記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列の相補配列からなるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用

いて、0.7～1.0 mol/LのNaCl存在下、65°Cでハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/L塩化ナトリウム、15 mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65°C条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カント・プロトコル・イン・モレキュラ・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLASTやFASTA等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号2、23、27および39記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列と少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。

ただし、本発明のDNAには、公知のDNAは含まれない。

本発明のポリペプチドの活性ドメインの一部、または全部を欠失したポリペプチドのなかには、本発明のポリペプチドのホスホリバーゼA₂活性を阻害するポリペプチドが存在する。このように、ホスホリバーゼA₂活性を阻害するポリペプチド（阻害ポリペプチド）は、ホスホリバーゼA₂サブタイプに特異的な阻害薬として、炎症やアレルギー等の脂質メディエイターの產生が発症および病態の進展に関与している可能性のある疾患を予防あるいは治療するために有用である。

該阻害ポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性に必須なアミノ酸を含む活性ドメインを少なくとも一部欠失していればよい。該阻害ポリペプチドとしては、例えば、配列番号3記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドがあげられる。

また、配列番号3に記載のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホリバーゼA₂活性を阻害する活性を有するポリペプチドおよび配列番号3に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつホスホリバーゼA₂活性を阻害する活性を有するポリペプチドも阻害ポリペプチドに包含される。このようなポリペプチドは、上記で述べた本発明のポリペプチドを取得する方法と同様な方法を用いて、例えば配列番号3記載のポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上

記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、1個から数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

また、本発明のポリペプチドがホスホリパーゼA₂活性を阻害する活性を有するためには、配列番号3に記載のアミノ酸配列との相同性はBLASTやFASTA等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上である。

阻害ポリペプチドをコードするDNAは、上記阻害ポリペプチドをコードするDNAであれば、どのような塩基配列を有していてもよい。該阻害ポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAがあげられる。

また、配列番号4記載の塩基配列の相補配列からなるDNAとストリングエントな条件下でハイブリダイズし、かつホスホリパーゼA₂活性を阻害する活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAも本発明のDNAに包含される。

上記の「配列番号4記載の塩基配列の相補配列からなるDNAとストリングエントな条件下でハイブリダイズし、かつホスホリパーゼA₂活性を阻害する活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA」とは、配列番号4記載の塩基配列の相補配列からなるDNAをプローブとして、本発明のDNAにおける方法と同様な方法を用いることにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLASTやFASTA等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号4記載の塩基配列と少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の相同性を有するDNAを挙げができる。

以下、本発明について詳細に説明する。

[1] 本発明のDNAの取得およびオリゴヌクレオチドの調製

ヒトホスホリパーゼA₂β(GenBank: AAC78836)のアミノ酸配列と相同性をもつアミノ酸配列をコードするDNAを、遺伝子データベース、蛋白質データベースより、Blast、Smith-Waterman法等を利用したプログラムあるいはフレームサーチ(Compugen社製)相同性検索ソフトウェアを利用して検索する。

データベースとしてはGenBank、Swiss-Plot等の公的なデータベースを利

用することができる。

また私的なcDNAライブラリー中のクローンのcDNAを、ランダムかつ大規模に塩基配列決定し、得られた配列データを集積し、作製した私的なデータベースを利用することもできる。

得られた、ヒトホスホリバーゼA₂β(GenBank: AAC78836)の有するアミノ酸配列と相同性をもつアミノ酸配列をコードするDNAが、EST(Expressed Sequence Tag)のように、DNAの一部の塩基配列のみである場合は、以下のようにしてそのcDNAの全長を得ることができ、該cDNAより本発明のDNAを取得することができる。

本発明のDNAの起源が特に制限されることはないが、哺乳動物が好ましく、さらに好ましくはヒト、ラットおよびマウスである。

(1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNAあるいはmRNAを調製する。

全RNAを調製する方法として、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法〔Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)〕、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム(AGPC)法〔Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、及び実験医学 9, 1937 (1991)〕等を用いることができる。

全RNAからボリ(A)+RNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法(モレキュラー・クローニング第2版)やオリゴdTラテックスを用いる方法等を用いることができる。

ファースト・トラック・mRNA単離キット〔Fast Track mRNA Isolation Kit; Invitrogen社製〕、クイック・プレップ・mRNA精製キット〔Quick Prep mRNA Purification Kit; Pharmacia(ファルマシア)社製〕等のキットを用いて組織や細胞から直接mRNAを調製することができる。

適切な細胞または組織として、データベースから見出されたEST等が含まれていたcDNAライブラリーの種類を調べ、該ライブラリーを構築するために用いた細胞または組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

得られた全RNAあるいはmRNAを用い、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

cDNAライブラリー作製法として、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコル・イン・モレキュラ・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シン

セシス・アンド・プラスミド・クローニング〔SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning ; Gibco BRL社製〕やザップーcDNA・シンセシス・キット〔ZAP-cDNA Synthesis Kit、STRATAGENE(ストラタジーン)社製〕を用いる方法等をあげることができる。

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express〔STRATAGENE社製、Strategies, 5, 58 (1992)〕、pBluescript II SK(+)〔Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)〕、Lambda ZAP II (STRATAGENE社製)、 λ gt10、 λ gt11〔DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)〕、 λ TriplEx〔Clontech(クロンテック)社製〕、 λ ExCell〔Pharmacia(ファルマシア)社製〕、pT7T318U(Pharmacia社製)、pCD2〔Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)〕、pUC18〔Gene, 33, 103 (1985)〕、pAMo〔J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc(特開平05-336963)〕等を挙げることができる。

宿主微生物としては、大腸菌Escherichia coliに属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF'〔STRATAGENE社製、Strategies, 5, 81 (1992)〕、Escherichia coli C600〔Genetics, 39, 440 (1954)〕、Escherichia coli Y1088〔Science, 222, 778 (1983)〕、Escherichia coli Y1090〔Science, 222, 778 (1983)〕、Escherichia coli NM522〔J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)〕、Escherichia coli K802〔J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)〕、Escherichia coli JM105〔Gene, 38, 275 (1985)〕、Escherichia coli SOLRTM Strain(STRATAGENE社製)、Escherichia coli LE392(モレキュラー・クローニング第2版)等を用いることができる。

上記方法により作製したcDNAライブラリーに加え、市販のcDNAライブラリーも利用することができる。

市販のcDNAライブラリーとして、Clontech社、ライフテックオリエンタル社等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器cDNAライブラリーをあげることができる。

(2) 本発明のDNAの取得(i)

上記(1)で作製したcDNAライブラリーより、本発明のDNA又はその一部を含有するcDNAクローンを、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブラーク・ハイブリダイゼーション法〔モレキュラー・クローニング第2版〕等により選択することができる。

プローブとしては、一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーを用いて、PCR〔PCR Protocols, Academic Press (1990)〕を利用した

方法でcDNAの一部を増幅した断片や、一部明らかになっている塩基配列に基づいたオリゴヌクレオチドを利用することができる。

プライマーとして、全長cDNAの5'末端側および3'末端側の両方の塩基配列がEST等により明らかになっている場合には、その塩基配列に基づいて調製したプライマーを用いることができる。

該cDNAの両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)および3'-RACE [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)]により、プライマーに用いた配列よりも5'末端側および3'末端側のcDNA断片を得ることができる。

得られたcDNA断片を連結することにより、本発明の全長DNAを取得することができる。

また、上記cDNAライブラリーから取得されたcDNAが完全長のポリペプチドをコードしていない場合は、以下のようにして完全長のポリペプチドをコードするcDNAを得ることもできる。

各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNAライブラリーまたは上記記載の方法で作製できるcDNAライブラリーを鋳型にして、該cDNAに特異的なプライマーセットを用いてPCRを行うことにより、該cDNAに対応するDNAを発現する臓器や細胞を特定し、特定された臓器あるいは細胞由来のcDNAライブラリーに対し、該cDNAをプローブにしてコロニーハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第2版）を行うことにより改めて該cDNAの全長を含むcDNAをcDNAライブラリーから選択することができる。

各種臓器または各種細胞由来の一本鎖cDNAライブラリーは、常法または市販されているキットに従って作製することができるが、例えば以下に示す方法で作製できる。

各種臓器または各種細胞からグアニジウム チオシアネート フェノールークロロホルム法 [Anal. Biochem., 162, 156 (1987)]により全RNAを抽出する。必要に応じて、全RNAをデオキシリボヌクレアーゼI [Life Technologies (ライフ・テクノロジーズ) 社製]で処理し、混入の可能性がある染色体DNAを分解する。得られた全RNA各自について、オリゴ(dT)プライマーまたはランダムプライマーを用いてSUPERSCRIPTTM Preamplification System for First Strand cDNA System (Life Technologies社製)により、一本鎖cDNAライブラリーを作製できる。

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後、常法によりベクターに組み込み、

通常用いられる塩基配列解析方法、例えばSangerらのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕あるいはPerkin Elmer: 373 A・DNAシークエンサー、Pharmacia社製、LI-COR社製等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

上記方法により取得された本発明のDNAを含むプラスミドとして、例えば、配列番号2記載の塩基配列からなるDNAを有するプラスミドp5269+C5をあげることができる。

プラスミドp5269+C5を含有する大腸菌 *Escherichia coli* JM109/ p5269+C5は、FERM BP-7281として、平成12年8月25日付で、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（旧：工業技術院生命工学工業技術研究所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託されている。

また、上記方法で取得したDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒトおよびマウス由来の目的とするDNAを取得することができる。

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、ホスホアミダイト法を利用したPerkin Elmer社製のDNA合成機model 1392等をあげることができる。

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJ等の塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。

新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換したのちFASTA、フレームサーチ(FrameSearch)等の相同性検索プログラムを用いて、GenPept、PIR、Swiss-Prot等のアミノ酸配列データベースを検索することにより、相同性をもつ既存のDNAを検索することができる。

(ii) 阻害ポリペプチドをコードするDNAの取得

阻害ポリペプチドをコードするDNAは上記(2)-(i)で取得される本発明のDNAから、例えば、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の公知の方法で活性ドメイン部位と思われる部位を欠失させることにより得ることができる。

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドの調製

上述の方法で取得した本発明のDNAまたはDNA断片を用いて、常法あるいは上記のDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等の

オリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号2、23、27および39記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。該オリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度(Tm)および塩基数が極端に変わることのない上記のオリゴヌクレオチドが好ましい。

該オリゴヌクレオチドとして、例えば、配列番号13、14、28、29、30、31、46または47記載のオリゴヌクレオチドをあげることができ。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体（本明細書中では、オリゴヌクレオチド誘導体とも言う）も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'－P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxyazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'－O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'－メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

[2] 本発明のポリペプチドおよび阻害ポリペプチドの調製

(1) 形質転換体の作製

上記[1]に記載の方法により取得した本発明のDNAおよび阻害ポリペプチドをコードするDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプ

チドまたは阻害ポリペプチドを製造するために、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコル・イン・モレキュラ・バイオロジー等に記載された方法を用いることができる。

即ち、本発明のDNAまたは阻害ポリペプチドをコードするDNAを適当な発現ベクターのプロモータ下流に挿入した組換えベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドを製造することができる。

宿主細胞としては、微生物（細菌、酵母等）、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とするDNAを発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAまたは阻害ポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、本発明のDNAまたは阻害ポリペプチドをコードするDNAを有する組換えベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNAまたは阻害ポリペプチドをコードするDNA及び転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御するDNAが含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2〔いずれもBoehringer Mannheim（ベーリンガー・マンハイム）社より市販〕、pKK233-2（Pharmacia社製、pSE280〔Invitrogen（インビトリジョン）社製〕、pGEMEX-1〔Promega（プロメガ）社製〕、pQE-8〔QIAGEN（キアゲン）社製〕、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK (-)（STRATAGENE社製）、pTrs32(FERM BP-5408)、pGHA2(FERM BP-400)、p G K A 2 (FERM BP-6798)、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pGEX（Pharmacia社製）、pET-3〔Novagen（ノバジェン）社製〕、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen社製）、pMAL-c2（New England Biolabs社製）等を挙げることができる。

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモーター（Plac）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、T7プロモー

ター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、S P O 1 プロモーター、S P O 2 プロモーター、p e n P プロモーター等をあげることができる。また P trp を 2 つ直列させたプロモーター (P trp × 2) 、tac プロモーター、lacT7 プロモーター、lac I プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6 ~ 18 塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の D N A または阻害ポリペプチドをコードする D N A の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア (Escherichia) 属、セラチア (Serratia) 属、バチルス (Bacillus) 属、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へ D N A を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)] 、プロトプラスト法 (特開昭63-248394) 、エレクトロポレーション法 [Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)] 等を挙げることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115) 、YEpl24 (ATCC37051) 、YCpl50 (ATCC37419) 、pHS19、pHS15 等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモータ

一、ヒートショックポリペプチドプロモーター、 $MF\alpha 1$ プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターを挙げることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、シゾサッカロマイセス (Schizosaccharomyces) 属、クルイベロミセス (Kluyveromyces) 属、トリコスporon (Trichosporon) 属、シワニオミセス (Schwanniomyces) 属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983)] 等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pCDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pCDNA1、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pAGE107 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 [Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAMo、pAMoA、pAS3-3 (特開平2-227075) 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE(immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、 $S R \alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞またはNamalwa KJM-1細胞 [Cytotechnology, 1, 151 (1988)]、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-000299) 等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NSO等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法

〔*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413 (1987)〕、*Virology*, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル〔*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, W. H. Freeman and Company, New York (1992)〕、モレキュラー・バイオロジー・ア・ラボラトリー・マニュアル (*Molecular Biology, A Laboratory Manual*)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、*Bio/Technology*, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換えDNA導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられるDNA導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにInvitrogen社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレア・ポリヘドロシス・ウイルス(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞としてはSf9、Sf21(バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル)等、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (Invitrogen社製)等、カイコ卵巣由来の培養細胞としては*Bombyx mori* N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換えDNA導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

DNAの発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発

明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドを製造することができる。

また、患者の生体内から採取した細胞に、適切な本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドを発現させるための組換えベクターを導入した後、細胞を生体内に戻すことにより、本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドを患者の生体内で発現させることもできる。

(2) 形質転換体の培養

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチーブリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生素質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換

した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～8、30～40°C、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔PharMingen(ファーミンジェン)社製〕、Sf-900 II SFM培地〔Life Technologies社製〕、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRH Biosciences社製〕、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30°C等の条件下で1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

(3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75(三菱化学社製)等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(Pharmacia社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティーコロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まない溶液あるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドあるいはその糖鎖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

また、本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes & Dev., 4, 1288 (1990)〕、特開平05-336963、WO94/23021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドをF1agペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗F1ag抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes & Dev., 4, 1288 (1990)〕。更に、該ポリペプチドに対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

更に、本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドは、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。

また、Advanced ChemTech社、Perkin Elmer社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

精製した本発明のポリペプチドまたは阻害ポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えばDNAクローニングのためのタンパク質構造解析(平野久著、東京化学同人発行、1993年)に記載の

方法により実施可能である。

[3] 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

(1) ポリクローナル抗体の調製

上記[2]に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100μgが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリン等のキャリア蛋白質に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988)〕等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、該血清が充分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,(1988)〕、またはD E A E -セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(2) モノクローナル抗体の調製

(2-1) 抗体産生細胞の調製

上記(1)において、免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をM E M培地(日本製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200 r p mで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH 7.65)で1～2分間処理し赤血球を除去した後、M E M培地で3回洗浄し、

得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(2-2)骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株 P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI-1640培地にグルタミン（1.5mM）、2-メルカプトエタノール（ 5×10^{-5} mM）、ジエンタマイシン（10 μg/mL）および牛胎児血清（FCS）（CSL社製、10%）を加えた培地（以下、正常培地という）に、さらに8-アザグアニン（15 μg/mL）を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(2-3)ハイブリドーマの作製

(2-1)で取得した抗体産生細胞と(2-2)で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS（リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1L、pH 7.2）でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞=5～10:1になるよう混合し、1,200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37°Cで、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM培地2mLおよびジメチルスルホキシド(DMSO) 0.7mLを混合した溶液を0.2～1mL添加し、更に1～2分間毎にMEM培地1～2mLを数回添加する。

添加後、MEM培地を加えて全量が50mLになるように調製する。

該調製液を900 rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスビベットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン（10⁻⁴ mM）、チミジン（ 1.5×10^{-5} mM）およびアミノプロテリン（ 4×10^{-7} mM）を加えた培地〕100mL中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに100 μL/穴ずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中、37°Cで7～14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ〔Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter14 (1988)〕等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドに特異的に

に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(2-4)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットタイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釀法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、H T 培地(H A T 培地からアミノブテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(2-4)モノクローナル抗体の調製

ブリストン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペントデカン(Pristane) 0.5 mLを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(2-3)で取得した本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞5~20×10⁶細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000 r p mで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。ポリペプチドの量は、ローリー法あるいは280 nmでの吸光度より算出する。

[4] 本発明のポリペプチドのホスホリバーゼA₂活性の測定

上記[2]に記載の方法により、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等を宿主として、本発明のポリペプチドを発現させたもの、あるいは、アフリカツメガエル卵母細胞にDNAあるいはin vitroで調製したcRNAを用いてマイクロインジェクション法[Methods in Enzymology, 207, 225 (1992)、Methods in Enzymology, 254, 458 (1995)]により発現させたもの、in vitro翻訳産物等をホスホリバーゼA₂活性の測定に用いる。ホスホリバーゼA₂活

性は検出可能な試薬（例えば、放射性試薬、蛍光試薬または比色試薬）で標識された基質（例えば、1 - バルミトイル - 2 - [1 - ^{14}C] アラキドニル - ホスファチデルコリン）の加水分解物（例えば、[1 - ^{14}C] アラキドン酸）あるいは残存する基質を定量することにより測定する。また、標識していない基質、分解物を定量することにより測定することもできる〔Methods in Enzymology, 197, 3 (1991)〕。

[5] 本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの探索・同定および治療薬としての利用

上記〔4〕の活性測定に用いることのできる細胞、あるいは、後述〔7〕の方法で本発明のポリペプチドあるいはmRNAを発現していることの確認された組織、細胞等を含有する試料に、被験試料を添加し、上記〔4〕記載の方法で、ホスホリバーゼA₂活性を測定する。

試料の形態は、該組織または、細胞等が、ホスホリバーゼA₂活性を示すことのできる状態であればいかなる形態であってもよい。

被験試料の添加の有無における、本発明のポリペプチドのホスホリバーゼA₂活性の比較により、被験試料の中からホスホリバーゼA₂活性を増強する物質（アゴニスト）および阻害する物質（アンタゴニスト）をスクリーニングすることができる。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体あるいは誘導体を、また哺乳動物(例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等)の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。

上記の方法により取得される、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、治療薬として単独で用いることが可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として用いることが望ましい。

アゴニストは、糖尿病の予防薬または治療薬の成分として使用することができる。

アンタゴニストは、糖尿病も含む他の疾患、例えば、喘息、虚血性疾患、関節炎、リウマチ、敗血症、皮膚の炎症、動脈硬化、痛み、パーキンソン氏病、アルツハイマー病、悪性腫瘍、腎炎、糖尿病または虚血再灌流障害等の予防薬または治療薬の成分として使用することができる。アンタゴニストには、阻害ポリペプチドも包含される。

該治療薬の投与方法としては、治療に際し最も効果的な方法を使用することが望ましく、経口投与または、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与による方法を用いることができる。

該治療薬の剤形としては、軟膏剤、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、テープ剤等をあげることができる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等をあげることができる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造することができる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用い製造することができる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、例えば、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製することができる。

座剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製することができる。

噴霧剤は、上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニストをそのまま噴霧剤として用いることが可能であるが、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製した噴霧剤が好ましい。

担体として、具体的には乳糖、グリセリン等を例示することができる。

上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニスト、および担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤を調製することができる。

これらの非経口剤においても、経口剤で添加剤として例示した成分を添加することができる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。他の非ヒト哺乳動物に投与する場合も同様である。

[6] 本発明のポリペプチドの発現を調節する化合物（以下、発現調節化合物と略す）の探索および同定

(1) 本発明の抗体を用いた発現調節化合物の探索および同定

本発明のポリペプチドを発現する細胞を被験試料と接触させた後、本発明の抗体を用いることにより、本発明のポリペプチドの発現調節化合物を探索、同定することができる。

細胞としては、本発明のポリペプチドを発現している細胞、細胞株、組織ならいかなるものでも用いることができる。

例えば、下記[7]に記載した、抗体による免疫学的な検出方法によって該ポリペプチドの発現が認められた細胞、細胞株あるいは組織を用いることができる。

好適な細胞株として、例えば、腎由来の細胞株をあげることができる。

被験試料としては上記[5]の被験試料であげたものを用いることができる。

本発明のポリペプチドを発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞と接触させた後、本発明の抗体を用い、該細胞の発現したポリペプチド含量を定量する。定量する方法としては、例えば下記の免疫細胞染色を利用した方法をあげることができる。

培養付着細胞をP B S 緩衝液で洗浄し、0.05%トリプシン、0.02%EDTA(エチレンジアミン4酢酸)を含むP B S 緩衝液3mLを加え、余分な溶液を除いた後、37℃、5分間インキュベートすることによりフラスコより細胞を剥がす。

浮遊細胞については培養細胞をそのまま用いることができる。該細胞をP B S 緩衝液で洗浄後、固定液に懸濁する。固定液としては例えば3.7%ホルムアルデヒドを含むP B S 緩衝液を挙げることができる。室温にて30分間インキュベート後、P B S 緩衝液で洗浄し膜透過性反応液に懸濁する。膜透過性反応液としては例えば0.1% Triton X-100を含むP B S 緩衝液を挙げることができる。

該処理を行った細胞を免疫細胞染色用緩衝液(1% B S A、0.02%EDTA、0.05%アジ化ナトリウムを含むP B S)等に懸濁し、1~20×10⁵個ずつ丸底96穴プレートに分注する。

該プレートに、本発明のモノクローナル抗体を分注する。

モノクローナル抗体としては、上記[3](2-3)で取得した本発明のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマの培養上清、上記[3](2-4)で取得した精製モノクローナル抗体をあげることができる。更に、該モノク

ローナル抗体を標識した抗体も用いることができる。

モノクローナル抗体を標識した抗体としては、例えばビオチン標識した抗体をあげることができる。

ビオチン標識した抗体は公知の方法（酵素抗体法：学際企画刊1985年）で調製することができる。

上記抗体を、免疫細胞染色用緩衝液あるいは10%動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて0.1～50 μ g/mLの濃度になるように希釈する。

該希釈抗体を20～500 μ L/穴となるように上記96穴プレートに分注し、氷冷下で30分間放置する。

標識されていないモノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を洗浄する。FITC (fluorescein isothiocyanate) あるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは抗ラットイムノグロブリン抗体を0.1～50 μ g/mL程度の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液を50～500 μ L/穴ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。

ビオチン標識した該モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートにFITCあるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識したストレプトアビシンを50～500 μ L/穴ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。

両ケースとも、放置後、プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞をよく洗浄し、蛍光顕微鏡、セルソーター等により解析する。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチド含量を増加あるいは減少させる被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

本発明のポリペプチド含量を増加させる物質はアゴニストと同様に使用することができる。また、本発明のポリペプチド含量を減少させる物質は、アンタゴニストとして使用することができる。

(2) 本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写産物定量系を用いた探索および同定

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現する細胞を被験試料と接触させた後、該mRNA含量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現する細胞としては、例えば上記〔6〕(1)記載の細胞株を、被験試料としては上記〔5〕のものを用いることができる。

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを

発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞中の発現した該mRNAの含量を、通常のノーザンハイブリダイゼーション法、RNAのドットプロットハイブリダイゼーション法、RT-PCR法等を用い定量する。

ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよびRT-PCR法等に用いることのできるプライマーとして、本発明のポリペプチドをコードするDNA断片をあげることができる。

具体的には、配列番号2、23、27および39記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列中の連續した5~60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを好適に用いることができる。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチドをコードするmRNA含量を増加あるいは減少させる被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

本発明のポリペプチドをコードするmRNA含量を増加させる物質はアゴニストとして使用することができる。また、本発明のポリペプチドをコードするmRNA含量を減少させる物質はアンタゴニストとして使用することができる。

(3) レポーター遺伝子を用いる探索および同定

本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写を制御する領域(以下、転写制御領域と略す)の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含むプラスミドで形質転換された形質転換体と被験試料とを接触させた後、レポーター遺伝子によりコードされるポリペプチドの発現量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

転写制御領域は、通常、DNAの5'上流に含まれることが多い。本発明のポリペプチドをコードするDNAの5'上流領域は、例えばGenome Walker kits(Clontech社製)等を用いて調製することができる。また、該領域を適当な制限酵素を用い、適切な長さに切断した断片を転写制御領域として用いることができる。

レポーター遺伝子としては、該DNAの翻訳産物が細胞内で安定であり、該翻訳産物の存在量が容易に定量できるものであればいかなるものでも用いることができ、該DNAがコードするポリペプチドとして、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、 β -ガラクトシダーゼ(β -gal)、ルシフェラーゼ(luc)、 β -グルクロニダーゼ、エクオリン、グリーンフルオレッセントプロテイン(GFP)等をあげることができる。

該転写制御領域を含むレポータープラスミドを導入する宿主細胞として

は、いかなる細胞も用いることができるが、好適には、[6] (1) 記載の本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAの発現が認められている細胞株を用いることができる。

被験試料として、上記[5]のものを用いることができる。

転写制御領域の下流に常法によりレポーター遺伝子を連結し、作製したプラスミドを用い、常法により宿主細胞を形質転換する。

また、ポジティブセレクション用マーカー (G418耐性遺伝子等) およびネガティブセレクション用マーカー (単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼやジフテリア毒素Aフラグメント遺伝子等) をつないだジーンターゲティングベクターを作製し、本発明のポリペプチドをコードする染色体DNAの一部をレポーター遺伝子で置換した細胞株を作製することもできる [Nature, 336, 348 (1988)、Analytical Biochemistry, 214, 77 (1993)、Gene Targeting, The Practical Approach Series, IRL Press (1993)]。

該形質転換体を、例えば該細胞の増殖することができる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現したレポーター遺伝子にコードされたポリペプチドの量を、該ポリペプチドに適した方法で検出、定量する。

検出、定量法として、CATの場合には、例えば、モレキュラー・クローニング第2版、16章、60頁に記載の方法を、 β -galの場合には、例えば、モレキュラー・クローニング第2版、16章、66頁に記載の方法を、lucの場合には、例えば、実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法, 89(1994)に記載の方法を、GFPの場合には、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4653 (1997)記載の方法等をあげることができる。

被験試料を添加しない系と比較し、レポーター遺伝子にコードされたポリペプチド含量を増加あるいは減少させる被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

レポーター遺伝子にコードされたポリペプチド含量を増加させる物質はアゴニストとして使用することができる。また、レポーター遺伝子にコードされたポリペプチド含量を減少させる物質はアンタゴニストとして使用することができる。

[7] 本発明のDNA、ポリペプチド、抗体、アゴニスト、アンタゴニストおよび発現調節化合物の利用

(1) 本発明のDNAをプローブとして用いて、ヒトおよびマウスなど非ヒト哺乳動物の組織や細胞から上記1と同様にして抽出したRNAについてノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、その組織や

細胞における本発明のポリペプチドをコードするmRNAを検出あるいは定量することができる。

各種の組織でそのmRNAの発現量を比較することにより本発明のポリペプチドの組織発現分布を知ることができる。

(2) 本発明のオリゴヌクレオチドを本発明のDNAの特異的プライマーとして用いて、ヒトおよびマウスなど非ヒト哺乳動物の組織や細胞から上記〔1〕(1)と同様にして抽出したRNAについてRT-PCR〔reverse transcription PCR ; PCR Protocols (1990)〕を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの検出や定量を行うことができる。

RNAを定量する方法は、本発明のDNAが関与する病態の診断に用いることができる。

各種病態モデル動物において、該mRNAを定量することにより、病態における該DNA産物の重要性を明らかにすることができる。また、薬剤の有無による該mRNAの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、ヒトおよびマウスなど非ヒト哺乳動物の組織切片に対してin situハイブリダイゼーション〔Methods in Enzymology, 254, 419 (1995)〕を行うことにより、組織内での本発明のポリペプチドの発現細胞の特定等のより細かい発現分布を知ることができます。

これらの方法によって得られる、本発明のポリペプチドがどのような組織や細胞で発現しているかに関する情報および細胞がどのような刺激を受けたときに発現量が変化するかに関する情報は、本発明のポリペプチドの生理機能や病態への関与を解析するために有用である。

(4) 本発明のDNAをプローブとして用い、ゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーション〔モレキュラー・クローニング 第2版〕を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAの変異を検出することができる。

変異の検出を行うことにより、該DNAの変異が原因となっている可能性のある、例えば喘息、虚血性疾患、関節炎、リウマチ、敗血症、皮膚の炎症、動脈硬化、痛み、パーキンソン氏病、アルツハイマー病、悪性腫瘍、腎炎、糖尿病または虚血再灌流障害等の疾患の診断を行うことができる。

(5) 本発明のポリペプチドをコードするDNAをPCR等を用いて増幅して塩基配列を解析することにより、あるいはDNAチップ等を用いて解析を行うことにより、1塩基多型(single nucleotide polymorphisms ; SNP)などの多型を検出することができる。多型の検出を行うことにより、該DNAの多型が関連している可能性のある、例えば喘息、虚血性疾患、関節

炎、リウマチ、敗血症、皮膚の炎症、動脈硬化、痛み、パーキンソン氏病、アルツハイマー病、悪性腫瘍、腎炎、糖尿病または虚血再灌流障害等の疾患の診断を行うことができる。

(6) 本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド(RNA、DNAまたはその誘導体)を用い、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写もししくはmRNAの翻訳を抑制することにより〔化学, 46, 681 (1991)、Bio/Technology, 9, 358 (1992)〕、該DNAが発症に関与している可能性のある、例えば喘息、虚血性疾患、関節炎、リウマチ、敗血症、皮膚の炎症、動脈硬化、痛み、パーキンソン氏病、アルツハイマー病、悪性腫瘍、腎炎、糖尿病または虚血再灌流障害等の疾患の予防や治療に用いることができる。

上述のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳開始領域にある5～60塩基と相補的な塩基配列を基にして設計・調製し、生体内に投与する。

本発明のDNAを含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様の方法で投与することができる。

(7) 本発明のDNAを用い、上記〔2〕記載の方法により本発明のポリペプチドを取得することができる。

本発明のポリペプチドの用途としては、喘息、虚血性疾患、関節炎、リウマチ、敗血症、皮膚の炎症、動脈硬化、痛み、パーキンソン氏病、アルツハイマー病、悪性腫瘍、腎炎、糖尿病または虚血再灌流障害等の疾患の治療薬または予防薬があげられる。

本発明のポリペプチドを含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様の方法で投与することができる。

(8) 本発明のオリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖としてレトロウイルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス等のウイルスベクター、その他のベクターに組み込んで遺伝子治療用ベクターとし、遺伝子治療に用いることができる。

(9) 本発明のポリペプチドを抗原として用い、上記〔3〕記載の方法により本発明のポリペプチドに対する抗体を製造することができる。

本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて、本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量することができる。

具体的には、マイクロタイタープレートを用いるE L I S A法、酵素標識抗体法や蛍光抗体法による免疫組織染色、ウェスタンプロット法等を用いた検出法をあげることができる。

具体的には、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチE L I S A法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体を用いるラジオイムノアッセイ法等をあげることができる。

また、本発明の抗体は病理組織切片を用いた免疫組織染色にも利用できる。

本発明の抗体を用い、健常者および被験者の細胞または組織に存在する本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量し、その量を健常者と被験者とで比較し、発現量が変化しているかどうかを調べることにより、被験者の喘息、虚血性疾患、関節炎、リウマチ、敗血症、皮膚の炎症、動脈硬化、痛み、パーキンソン氏病、アルツハイマー病、悪性腫瘍、腎炎、糖尿病または虚血再灌流障害等の病態の診断に用いることができる。

また、本発明の抗体を用いて、各種病態モデル動物の組織および細胞に存在する該ポリペプチドを免疫学的に検出または定量し、正常動物と比較することにより、病態における該ポリペプチドの重要性を明らかにすることができる。さらに、薬剤の有無による該ポリペプチドの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

(10) 本発明のポリペプチドの機能(ホスホリバーゼA₂活性)を阻害する抗体を投与することにより、喘息、虚血性疾患、関節炎、リウマチ、敗血症、皮膚の炎症、動脈硬化、痛み、パーキンソン氏病、アルツハイマー病、悪性腫瘍、腎炎、糖尿病または虚血再灌流障害等の疾患を治療または予防することができる。

本発明の抗体を含有する医薬は、上記[5]の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記[5]の場合と同様の方法で投与することができる。

以下により具体的な実施例をあげて説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

なお、実施例中では、ホスホリバーゼA₂をPLA₂、細胞質ホスホリバーゼA₂をcPLA₂と略記する。

図面の簡単な説明

第1図は、プラスミドp5269+C5の構築を示した図である。

第2図は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(上段：第121～476番目)と、ヒトcPLA₂α(GenBank：AAA60105)のアミノ酸配列(下段：第1～第309番目)との比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)下線はGXSGSモチーフを示す。

第3図は、第2図の続きである。配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(上段：第477～849)と、ヒトcPLA₂α(GenBank：AAA60105)のアミノ酸配列(下段：第310～729番目)との比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)

第4図は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(上段：第1～400番目)と、ヒトcPLA₂β(GenBank：AAC78836)のアミノ酸配列(下段：第181～571番目)との比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)下線はGXSGSモチーフを示す。

第5図は、第4図の続きである。配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(上段：第401～849番目)と、ヒトcPLA₂β(GenBank：AAC78836)のアミノ酸配列(下段：第572～1012番目)との比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)

第6図は、ヒト由来の本発明のポリペプチドをコードするcDNAの塩基配列情報を基にPCRプライマーを設計し、ヒト各組織のmRNAより調製したcDNAを鑄型にPCRを行なった結果を示した図である。増幅産物をアガロースゲル電気泳動した結果を示す。—はコントロール(cDNA無添加)を示す。

第7図は、プラスミドp600-Nの構築過程および制限酵素地図を示した図である。

第8図は、ヒト由来の本発明のポリペプチドをコードするcDNAの一部の塩基配列(約0.6kb)をプローブとしてヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓のpoly(A)⁺RNAフィルター〔Human Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)〕に対してノーザンハイブリダイゼーションを行なった結果を示した図である。

第9図は、プラスミドpPLAH-1393の構築過程および制限酵素地図を示した図である。

第10図は、ヒト由来の本発明のポリペプチドを発現している昆虫細胞の可溶性画分におけるPLA₂活性測定の結果を示す。1393はベクターのみから作製したウイルスを感染させた昆虫細胞、PLAHは該ヒト由来の本発明のポリペプチドを発現している昆虫細胞を示す。横軸はポリペプチドの量(μg)、縦軸は、PLA₂活性(dpm)を示す。

第11図は、ヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(上段：第1～第300番目)と、マウス由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(下段：第1～第296番目)とのアミノ酸配列の比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す)

第12図は、ヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(上段：第301～第539番目)と、マウス由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(下段：第297～第536番目)とのアミノ酸配列の比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す)

第13図は、ヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(上段：第540～第849番目)と、マウス由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(下段：第537～第854番目)とのアミノ酸配列の比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す)

第14図は、ヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(下段)と、ラット由来の本発明のポリペプチドの断片アミノ酸配列(上段)との比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。

第15図は、マウスおよびラット由来の本発明のポリペプチドをコードするcDNAの塩基配列情報を基にPCRプライマーを設計し、マウスおよびラット各組織のmRNAより調製したcDNAを鋳型としてPCRを行なった後、増幅産物をアガロースゲル電気泳動した結果を示す。ーはコントロール(cDNA無添加)を示す。

第16図は、ヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(上段：第1～第473番目)、マウス由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(中段：第1～第470番目)およびBALB/Cマウス由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(下段：第1～第469番目)との比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)

第17図は、第16図の続きである。ヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(上段：第474～第849番目)、マウス由来の本発明のポリペ

プチドのアミノ酸配列(中段: 第471～第854番目)およびBALB/Cマウス由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(下段: 第470～第853番目)との比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)

第18図は、プラスミドp_mPLAH-1393の構築過程および制限酵素地図を示した図である。

第19図は、ウイルスを感染させた昆虫細胞の可溶性画分におけるPLA₂活性を測定した結果を示した図である。m-1393Vはベクターのみから作製したウイルスを感染させた昆虫細胞、m-cPLA2Hは該マウス由来の本発明のポリペプチドを発現している昆虫細胞を示す。

第20図は、ウイルスを感染させた昆虫細胞の可溶性画分におけるPLA₂活性のカルシウム濃度依存性を測定した結果を示した図である。m-1393Vはベクターのみから作製したウイルスを感染させた昆虫細胞、m-cPLA2Hはマウス由来の本発明のポリペプチドを発現している昆虫細胞を示す。

第21図は、ウイルスを感染させた昆虫細胞の可溶性画分におけるPLA₂活性の反応時間依存性を測定した結果を示した図である。m-1393Vはベクターのみから作製したウイルスを感染させた昆虫細胞、m-cPLA2Hはマウス由来の本発明のポリペプチドを発現している昆虫細胞を示す。

第22図は、ヒト由来の本発明のポリペプチドをコードするDNA、ヒトcPLA₂ α 、ヒトG3PDHの塩基配列情報を基にPCRプライマーを設計し、ヒト培養細胞株(K-562、HL-60、Jurkat、293EBNA、DU145、PC-3、LNCaP.FGS)のRNAより調製したcDNAを鋳型にPCRを行なった後、増幅産物をアガロースゲル電気泳動した結果を示した図である。

第23図は、ヒト由来の本発明のポリペプチドをコードするcDNAの一部の塩基配列(約0.6kb)をプローブとしてヒト胎児心臓、腎臓、皮膚、小腸および成人肺のpoly(A)⁺RNAフィルター[Human Fetal Normal Tissue mRNA Northern Blot II(Biochain社製)]に対してノーザンハイブリダイゼーションを行なった結果を示した図である。

符号の説明

kb : キロ塩基対 (kilobase pairs)

Ap:アンピシリン耐性遺伝子

T7 : T7プロモーター

BAP : 細菌由来アルカリホスファターゼ

Flag : Flagタグ

発明を実施するための最良の形態

実施例 1 ヒト由来の本発明のポリペプチドをコードするcDNAのクローン化

以下、遺伝子操作は特に断らない限り公知のモレキュラー・クローニング 第2版に記載されている方法に従って行なった。

(1) ヒト小腸由来cDNAライブラリーの作製

ヒト小腸から、Pharmacia社製のRNA Extraction Kit (#27-9270-01) を用いてTotal RNAを抽出後、文献 (J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) に記載されているPolyA(+)RNA精製法に準じmRNAを抽出し、精製した。

それぞれのpolyA(+)RNAよりオリゴキャップ法[Gene, 138, 171 (1994)]によりcDNAライブラリーを作製した。Oligo-cap linker (配列番号5) および Oligo dT primer (配列番号6) を用いて、文献[蛋白質 核酸 酶素, 41, 197 (1996)、Gene, 200, 149 (1997)]に従ってBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) 処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。

次いで、5'末端側と3'末端側のPCRプライマー (配列番号7、8) を用いたPCR(polymerase chain reaction)により2本鎖cDNAに変換した後、制限酵素 SfiIで切斷した。該cDNAをDraIIIで切斷したベクター pME18SFL3 (GenBank AB009864, Expression vector, 3392bp) に組み込み、cDNAライブラリーを作製した。cDNAは発現が可能なように一方向に組み込まれた。

(2) ランダムシークエンス

上記(1)で調製したcDNAライブラリーとしての各大腸菌クローンから常法に従ってプラスミドDNAを取得し、各プラスミドが含有するcDNAの5'末端の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、キット (BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems社製) とDNAシークエンサー (ABI PRISM 377, PE Biosystems社製) を用いて行った。配列番号9および10に示す塩基配列を有するDNAを合成し、該合成DNAをプライマーとして使用した。

(3) 相同性検索ソフトウェアを用いた解析

得られた塩基配列についてはblastnサーチ相同性検索ソフトウェアを用いて解析し、cPLA₂に相同性の認められる塩基配列を見出した。該塩基配列を有すると思われるクローン(c-hsi05269)の全塩基配列を決定した結果、プラスミドc-hsi05269には配列番号4に記載された約1.5kbの塩基配列を有するcDNAが含まれていた。該塩基配列によりコードされる新規ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号3に示す。

(4) cPLA₂との相同領域を完全に含むcDNAのクローン化

上記(3)で得られた塩基配列情報をもとに配列番号11および配列番号12記載の塩基配列を有するDNAプライマーを設計し、Human Kidney Marathon-Ready cDNAキット(Clontech社製)を用いて、以下に示す方法によりC末端領域をPCR増幅した。

即ち、Human Kidney Marathon-Ready cDNA 2 μ L、配列番号11記載の塩基配列を有するDNAプライマーおよびAP1(キットに添付)のプライマー各々0.2 μ mol/L、各成分を200 μ mol/Lずつ含有するdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)の混合液、Advantage 2 ポリメラーゼ混合液(Clontech社製)0.5 μ Lおよび1×Advantage 2 PCR緩衝液を含む反応溶液20 μ Lを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラー PTC-200(MJリサーチ社製)を用い、95°Cで3分間加熱後、94°Cで15秒間、72°Cで4分間の工程を1サイクルとして5サイクル、94°Cで15秒間、70°Cで4分間の工程を1サイクルとして5サイクル、94°Cで15秒間、68°Cで4分間の工程を1サイクルとして20サイクル行なった。続いて、得られたPCR反応液の100倍希釈液5 μ L、配列番号12記載の塩基配列を有するDNAプライマーおよびAP2(キットに添付)のプライマー各々0.2 μ mol/L、各成分を200 μ mol/Lずつ含有するdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)の混合液、Advantage 2 ポリメラーゼ混合液1 μ Lおよび1×Advantage 2 PCR緩衝液を含む反応溶液50 μ Lを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラー PTC-200を用い、95°Cで3分間加熱後、94°Cで15秒間、68°Cで4分間の工程を1サイクルとして30サイクル行なった。得られた該PCR反応液より5 μ Lを分取し、アガロースゲル電気泳動により約2.5kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従ってDNA断片を精製した。

得られたDNA断片50ngとpCR2.1 T-Vector(Invitrogen社製)50ngとをDNA Ligation Kit Ver. 2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpPL-Cを得た。

プラスミドpPL-Cに含まれるDNA断片の塩基配列を常法によって決定したところ、挿入されたDNA断片は挿入された断片中のAccI部位でc-hsi05269のAccI部位と連結可能であることが分かった。

プラスミドc-hsi05269 2 μ gを10mmol/Lトリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L塩化マグネシウム、1mmol/Lジチオスレイトール(以下、DTTと略記する)、50mmol/L塩化ナトリウムからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のAccI(宝酒造社製)を加えて37°Cで3時間消化反応を行なった。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、得られた沈殿を50mmol/Lトリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L塩化ナトリウムか

らなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のEcoRI(宝酒造社製)を加え、37℃で3時間消化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてEcoRI-AccI断片(1.3kb)を精製した。

また、プラスミドpPL-C 2μgを10mmol/L トリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、50mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のAccI(宝酒造社製)を加えて37℃で3時間消化反応を行なった。

フェノール抽出とエタノール沈殿の後、得られた沈殿を50mmol/L トリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のNotI(宝酒造社製)を加え、37℃で3時間消化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてAccI-NotI断片(2.2kb)を精製した。

一方、プラスミドpBluescriptII KS(-)(STRATAGENE社製) 2μgを50mmol/L トリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のEcoRIおよびNotI(宝酒造社製)を加え、37℃で6時間消化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてEcoRI-NotI断片(3.0kb)を精製した。

上記で得られたプラスミドc-hsi05269由来のEcoRI-AccI断片(1.3kb)50ng、プラスミドpPL-C由来のAccI-NotI断片(2.2kb)50ngおよびpBluescriptII KS(-)由来のEcoRI-NotI断片(3.0kb)50ngをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドp5269+C5を得た。該プラスミドの構築過程および制限酵素地図を第1図に示す。

該プラスミドp5269+C5を保有する大腸菌JM109株は、ブダペスト条約に基づき、Escherichia coli JM109/p5269+C5(FERM BP-7281)として、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（旧：工業技術院生命工学工業技術研究所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成12年8月25日付で寄託されている。

連結した塩基配列は配列番号2記載の塩基配列を有しており、配列番号1記載のアミノ酸配列を有する新規なポリペプチドをコードしていた。

また、既知タンパク質配列データベース（GenBank等）に対して、該アミノ酸配列のSmith & Waterman検索を行なったところ、cPLA₂ファミリーの

ポリペプチドとの相同意が強く検出された。そこで、ヒトcPLA₂αアミノ酸配列(GenBank : AAA60105)、ヒトcPLA₂βアミノ酸配列(GenBank : AAC78836)を選択してアライメントを作製した。

第2図および第3図にヒトcPLA₂α配列、第4図および第5図にヒトcPLA₂β配列とのアライメント結果を示す。cPLA₂に共通したアミノ酸配列であるGXSGS配列(配列番号15)も認められた(第2図、第4図の下線部)。

実施例2：RT-PCR法を用いた発現解析

実施例1で決定した塩基配列の情報を基に配列番号13記載の塩基配列を有する5'端側DNAプライマーと配列番号14記載の塩基配列を有する3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。

2種類のプライマー(配列番号13および配列番号14)各々1.0 μmol/L、ヒト各組織mRNAから作製したcDNAライブライマーー2μL、各成分を200 μmol/Lずつ含有するdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)の混合液、Taq Goldポリメラーゼ(Perkin Elmer社製)2.5単位および1×Taq Gold (Mg plus) 緩衝液(Perkin Elmer社製)を含む反応溶液20 μLを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラーPTC-200(MJ リサーチ社製)を用い、95°Cで10分間加熱後、94°Cで1分間、60°Cで1分間の工程を1サイクルとして35サイクル行い、更に72°Cで8分間加熱した。

得られたPCR反応液より7 μLを分取し、アガロースゲル電気泳動により、予想される約0.6kbのDNA断片の増幅を確認した。腎臓、肺、前立腺、胸腺、甲状腺、気管、子宮で強い発現が認められた。電気泳動結果を第6図に示す。

実施例3：ノーザンハイブリダイゼーションによるmRNAの発現解析

2種類のプライマー(配列番号13および配列番号14)各々0.2 μmol/L、各成分を200 μmol/Lずつ含有するdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)の混合液、Human Kidney Marathon-Ready cDNA 2μL、Ampli Taq Goldポリメラーゼ(Perkin Elmer社製)2.5単位および1×Taq Gold緩衝液を含む反応溶液50 μLを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラー PTC-200を用い、95°Cで10分間加熱後、94°Cで1分間、60°Cで1分間の工程を1サイクルとして35サイクル行ない、更に72°Cで8分間加熱した。

得られたPCR反応液より5 μLを分取し、アガロースゲル電気泳動により約0.6kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて添付のマニュアルに従ってDNA断片を精製した。

得られたDNA断片50ngとpT7Blue T-Vector 50ngとをDNA Ligation Kit(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりノーザン解析プローブ作製用プラスミドp600-Nを調製した。該プラスミドの構築過程および制限酵素地図を第7図に示す。

調製したプラスミドp400-N 10 μ gを10mmol/L トリス-塩酸(pH7.5) 10mmol/L 塩化マグネシウム、50mmol/L 塩化ナトリウム、1mmol/L DTTからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、30単位のBamHI(宝酒造社製)を加え、37°Cで6時間消化反応を行なった。該反応液に対してフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈殿を行ない、DNA断片を回収した。

該DNA断片の1 μ gを、40mmol/L トリス-塩酸(pH8.0)、6mmol/L 塩化マグネシウム、2mmol/L スペルミジン、10mmol/L DTT、1mmol/L ATP、1mmol/L CTP、1mmol/L GTP、0.65mmol/L UTP、0.35mmol/L ディゴキシゲニン-11-UTPを含む緩衝液50 μ Lに溶解し、40単位のT7 RNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim社製)を添加し、37°Cで2時間in vitro転写反応を行なった。

反応後、得られた反応液より、エタノール沈殿によりディゴキシゲニン標識cRNAプローブを回収した。

該プローブを用いて、ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓のpoly(A)⁺ RNAフィルター〔Human Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)〕に対して、以下に示す方法に従いノーザンハイブリダイゼーションを行なった。

各臓器のpoly(A)⁺ RNAフィルターを、50%ホルムアミド、5倍濃度のSSC(1倍濃度のSSCの組成は、150mmol/L 塩化ナトリウムおよび15mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる)、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム(以下、SDSと略記する)、2% ブロッキング試薬(Boehringer Mannheim社製)、0.1mg/mL サケ精子DNAを含む緩衝液(以下、ハイブリダイゼーションバッファーと略記する)中に浸漬し、70°Cで2時間プレハイブリダイゼーションを行なった。

該フィルターを、上述のディゴキシゲニン標識cRNAプローブが1 μ g/mLの濃度で溶解しているハイブリダイゼーションバッファーに浸漬し、70°Cで15時間ハイブリダイゼーションを行なった。

該フィルターを2倍濃度のSSC、0.1% SDSよりなる緩衝液中で70°C、10分間浸漬する条件で1回、0.2倍濃度のSSC、0.1% SDSよりなる緩衝液中で70°C、30分間浸漬する条件で3回洗浄した。

該フィルターを100mmol/L マレイン酸(pH7.5)、150mmol/L 塩化ナトリウムよりなる緩衝液(以下、DIG I緩衝液と略記する)中で室温、15分間

浸漬する条件で2回洗浄し、SDSを除去した。

該フィルターを100mmol/L マレイン酸（pH7.5）、150mmol/L 塩化ナトリウム、1% ブロッキング試薬よりなる緩衝液（以下、DIG II緩衝液と略記する）に浸漬し、1時間室温にてブロッキングを行なった。

該フィルターを、DIG II緩衝液で10000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ディゴキシゲニン抗体Fabフラグメント（Boehringer Mannheim社製）溶液中に浸漬し、室温で30分間抗原抗体反応を行なった。

該フィルターをDIG I緩衝液で室温、30分間浸漬する条件で3回洗浄し、余分な抗体を除去した後、100mmol/L トリス－塩酸（pH9.0）、100mmol/L 塩化ナトリウム、50mmol/L 塩化マグネシウムからなる緩衝液（以下、DIG III緩衝液と略記する）に5分間浸漬し平衡化した。

該フィルターを、DIG III緩衝液で100倍に希釈した発光基質CDP-Star（Boehringer Mannheim社製）溶液中に室温で15分間浸漬し、シグナルを発光させ、CCDカメラ（富士写真フィルム社製）で検出した。

結果を第8図に示す。腎臓、肺において約3.5キロヌクレオチドおよび6キロヌクレオチドのバンドが認められた。また、骨格筋、心臓において約3.5キロヌクレオチドのバンドが認められた。

実施例4 ヒト由来の本発明のポリペプチドの昆虫細胞を用いた発現と該ポリペプチドのホスホリパーゼA₂活性の測定

(1) バキュロウイルス作製用プラスミドの構築

上記実施例1で得られた塩基配列をもとに配列番号16および配列番号17に記載の塩基配列を有するDNAプライマーを設計し、以下の方法に従って、Flagタグを挿入したN末端領域をPCR増幅した。

上記実施例1で得られたプラスミドc-hsi05269 10ng、配列番号16および配列番号17で表される塩基配列を有するプライマー各々0.3 μmol/L、各成分を300 μmol/Lずつ含有するdNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) の混合液、硫酸マグネシウム液 1mmol/L、Pfx DNAポリメラーゼ(ライフテクノロジー社製)混合液0.5 μLおよび1×Pfx DNAポリメラーゼ緩衝液を含む反応溶液20 μLを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラー PTC-200(MJリサーチ社)を用い、95°Cで3分間加熱後、94°Cで1分間、68°Cで1分間の工程を1サイクルとして25サイクル行なった後、68°Cで5分間の反応を行なった。得られたPCR反応液より5 μLを分取し、アガロースゲル電気泳動により約1.4kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従ってDNA断片を精製した。

得られたDNA断片50ngとT7Blue T-Vector(Novagen社製)50ngとをDNA

Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpMF2を得た。

一方、上記実施例1で得られた塩基配列をもとに配列番号18およびプラスミドpPL-C中の配列番号19に記載の塩基配列を有するDNAプライマーを設計し、C末領域をPCRにより増幅した。

即ち、プラスミドpPL-C 10ng、配列番号18および配列番号19に記載の塩基配列を有するプライマー各々0.3 μmol/L、各成分を300 μmol/Lずつ含有するdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)の混合液、硫酸マグネシウム液1mmol/L、Pfx DNAポリメラーゼ(ライフテクノロジー社製)混合液0.5 μLおよび1×Pfx DNAポリメラーゼ緩衝液を含む反応溶液20 μLを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラー PTC-200(MJリサーチ社)を用い、95°Cで3分間加熱後、94°Cで1分間、68°Cで1分間の工程を1サイクルとして25サイクル行なった後、68°Cで5分間の反応を行なった。得られたPCR反応液より5 μLを分取し、アガロースゲル電気泳動により約1.5kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従ってDNA断片を精製した。

得られたDNA断片50ngとT7Blue T-Vector(Novagen社製)50ngとをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpC5PCRを得た。

プラスミドpMF2およびプラスミドpC5PCRに含まれるDNA断片の塩基配列は常法によって決定し、これらの挿入されたDNA断片を挿入されたDNA断片中に存在するAccI部位を用いて下記条件で連結した。

即ち、プラスミドpMF2 2 μgを20mmol/L トリスー塩酸(pH8.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化カリウムからなる緩衝液50 μLに溶解し、10単位のBamHI(宝酒造社製)を加えて37°Cで3時間消化反応を行なった。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、得られた沈殿を10mmol/L トリスー塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、50mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50 μLに溶解し、10単位のAccI(宝酒造社製)を加え、37°Cで3時間消化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてBamHI-AccI断片(1.3kb)を精製した。

また、プラスミドpC5PCR 2 μgを50mmol/L トリスー塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50 μLに溶解し、10単位のEcoRI(宝酒造社製)を加えて37°Cで3

時間消化反応を行なった。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、得られた沈殿を10mmol/L トリスー塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、50mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のAccI(宝酒造社製)を加え、37°Cで3時間消化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてAccI-EcoRI断片(1.4kb)を精製した。

一方、プラスミドpcDNA3.1(Invitrogen社製)2μgを20mmol/L トリスー塩酸(pH8.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化カリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のBamHI(宝酒造社製)を加えて37°Cで3時間消化反応を行なった。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、得られた沈殿を50mmol/L トリスー塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のEcoRI(宝酒造社製)を加え、37°Cで3時間消化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてBamHI-EcoRI断片(5.4kb)を精製した。

得られたプラスミドpMF2由来のBamHI-AccI断片(1.3kb)50ngと、プラスミドpC5PCR由来のAccI-EcoRI断片(1.4kb)50ngおよびpcDNA3.1由来のBamHI-EcoRI断片(5.4kb)50ngとをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpPLAH-3.1を得た。

続いて、プラスミドpPLAH-3.1 2μgを20mmol/L トリスー塩酸(pH8.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化カリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のBamHI(宝酒造社製)を加えて37°Cで3時間消化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてBamHI断片(2.7kb)を精製した。

一方、プラスミドpVL1393(PharMingen社製)2μgを20mmol/L トリスー塩酸(pH8.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化カリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のBamHI(宝酒造社製)を加えて37°Cで3時間消化反応を行なった。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、得られた沈殿を50mmol/L トリスー塩酸(pH9.0)、1mmol/L 塩化マグネシウムからなる緩衝液30μL中に溶解し、0.5単位のアルカリホスファターゼ(宝酒造社製；*E. coli* C75由来)を加えて、60°Cで30分間脱リン酸化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてBamHI-アルカリホスファターゼ処理済み断片(9.6kb)を精製した。上記で回収したプラスミドpPLAH-3.1由来の

BamHI断片(2.7kb)50ngと、プラスミドpVL1393由来のBamHI-アルカリホスファターゼ処理済み断片(9.6kb)50ngとをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpPLAH-1393を得た。該プラスミドの構築過程および制限酵素地図を第9図に示す。

(2) 組み換えバキュロウイルスの作製

ウイルスの作製方法はバキュロウイルス発現ベクターシステムマニュアル(PharMingen社製)に記載されている方法に従って行なった。

即ち、 2×10^6 個のSf9細胞を直径6cmシャーレに播種し、接着後、無血清培地(Sf-900IIISFM、ライフテック社より購入)に交換した。上記(1)で作製したプラスミドpPLAH-1393またはpVL1393 5μg、Linealized Baculogold DNA(PharMingen社製)15ng、リポフェクチン液(ライフテクノロジー社製)6ngを含むDNAリポフェクチン混合液24μLを、上記の無血清培地の入ったシャーレに均一になるように添加し27°Cで4日間培養した。血清入りの培地(Esf921、旭テクノグラス社より購入)を2mL添加し、さらに27°Cで3日間培養した。細胞を回収後、800rpm、5分間遠心分離して上清を得た。得られた上清を、接着させたSf9細胞に添加し、27°Cで3日間培養した。細胞を回収後、800rpm、5分間遠心分離してウイルスを含有する上清を得た。

(3) 発現昆虫細胞可溶性画分の調製

1.5×10^6 個/mLの浮遊Sf9細胞28mLに上記(2)で回収したウイルスを含有する上清2mLを添加し浮遊状態で27°Cにて4日間培養した。800rpm、5分間の遠心分離により細胞を回収し、phosphate-buffered saline(PBS)にて細胞を洗浄した。25mmol/L トリス-塩酸(pH 7.5)、140mmol/L 塩化ナトリウム、5mmol/L 塩化カリウム、2mmol/L EDTA、1× complete、EDTA-free(ペーリンガーマンハイム社製)からなる緩衝液に得られた細胞を懸濁し、超音波破碎機を用い氷上で細胞を破壊した。上記抽出液を15,000rpmで15分間遠心分離し、上清をPLA₂活性の測定に用いた。

(4) PLA₂活性の測定

1 - パルミトイル - 2 - [1 - ¹⁴C] アラキドニル-ホスファチデルコリン(48mCi/mmol、第一化学薬品社製)(2μmol/L)および上記で得られた上清を含有する100μLの反応液[100mmol/Lトリス-塩酸(pH7.5)、4mmol/L塩化カルシウム、1mg/mL牛血清アルブミン(実質的に脂肪酸を含まない。シグマ社製)、8μmol/LトリトンX-100]を37°Cで2時間インキュベートした後、ドール試薬(2 - プロパノール/ヘプタン/硫酸を78:20:2の割合で含む)を添加して反応を停止した。さらにヘプタン0.3mLおよび水0.2mLを加え、旋回して混合した。得られた混合物を3,000rpmで5分間遠

心分離し、得られた上層のうち0.32mLをシリカゲル(Silica gel 60、メルク社製)40mgを含有するチューブに移し、さらにヘプタン0.3mLを添加した。そのチューブを旋回して混合した後、3,000rpmで5分間遠心分離した。得られた上清のうち400μLを、ウルチマゴールド(Packard社製)3mLを入れたシンチレーションバイアルに移し、液体シンチレーションカウンター(Beckman LS6500)を用いて放射活性を測定した。ポリペプチドの量は、Bio Rad Protein Assay法を用いて定量した。コントロールとしてプラスミドpVL1393から作製したウイルスを導入した昆虫細胞の可溶性画分を用いた。結果を第10図に示す。

第10図に示された結果から、上記実施例1で得られたヒト由来の本発明のポリペプチドは、1-パルミトイル-2-アラキドニル-ホスファチヂルコリンのs.n-2位のエステル結合を加水分解するPLA₂活性を有することが示された。

実施例5 マウス由来の本発明のポリペプチドをコードするDNAのクローン化

上記実施例4でPLA₂活性を有することが示されたヒト由来の本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列情報を基にプラスチサーチ相同意検索ソフトウェアを用いて解析し、相同意の認められるEST配列(Genbank ACCESSION BF299949)を見出した。該クローン入手(コスマバイオ社)し、全塩基配列を決定した結果、プラスミドpBF299949には配列番号4に記載の塩基配列と高い相同意を有する塩基配列を有するcDNAが含まれていることがわかった。

該塩基配列情報をもとに配列番号20および配列番号21に記載の塩基配列を有するDNAプライマーを設計し、Mouse Lung Marathon-Ready cDNAキット(Clontech社製)を用いて、以下に示す方法によりN末端領域をPCRで増幅した。

即ち、Mouse Lung Marathon-Ready cDNA 2μL、配列番号20記載の塩基配列を有するプライマーおよびAP1(キットに添付)のプライマー各々0.2μmol/L、各成分を200μmol/Lずつ含有するdNTP(dATP、dTTP、dGTP、dCTP)の混合液、Advantage 2 ポリメラーゼ混合液(Clontech社製)0.5μLおよび1×Advantage 2 PCR緩衝液を含む反応溶液20μLを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラー PTC-200(MJリサーチ社)を用い、95°Cで3分間加熱後、94°Cで15秒間、72°Cで4分間の工程を1サイクルとして5サイクル、94°Cで15秒間、70°Cで4分間の工程を1サイクルとして5サイクル、94°Cで15秒間、68°Cで4分間の工程を1サイクルとして20サイクル行なった。続いて、

得られたPCR反応液の100倍希釀液5μL、配列番号21記載の塩基配列を有するプライマーおよびAP2(キットに添付)のプライマー各々0.2μmol/L、各成分を200μmol/Lずつ含有するdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)の混合液、Advantage 2 ポリメラーゼ混合液1μLおよび1×Advantage 2 PCR緩衝液を含む反応溶液50μLを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラー PTC-200を用い、95°Cで3分間加熱後、94°Cで15秒間、68°Cで3分間の工程を1サイクルとして25サイクル行なった。得られたPCR反応液より5μLを分取し、アガロースゲル電気泳動により約0.3kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従ってDNA断片を精製した。

得られたDNA断片50ngとT7Blue T-Vector(Novagen社製)50ngとをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドp432-3を得た。

得られたプラスミドp432-3に含まれるDNA断片の塩基配列を常法によって決定したところ、挿入されているDNA断片はプラスミドpBF299949と連結可能であることが判明した。挿入されているDNA断片の塩基配列を配列番号23に示した。該塩基配列によりコードされる新規ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号22示す。

該アミノ酸配列を、解析プログラム[GENETYX WIN ver.2.1(ソフトウェア社製)]を用いてヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列と比較したところ、72.6%の一一致が認められた。

アライメント解析の結果を第11図～第13図に示す。第12図は第11図の続きであり、第13図は第12図の続きである。

実施例6 ラット由来の本発明のポリペプチドをコードするDNAのcDNA断片のクローン化

ヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列情報を用いて2つの合成プライマーの混合物を作製した。

一方の合成プライマーの混合物は、配列番号24に示される塩基配列において3番目、6番目および7番目の塩基がcまたはt、9番目および15番目の塩基がa、c、gまたはt、12番目の塩基がaまたはgである塩基配列を有するプライマーの混合物、他方のプライマーの混合物は配列番号25に示される塩基配列において1番目の塩基がcまたはt、7番目の塩基がa、c、gまたはt、4番目、10番目および13番目の塩基がaまたはgである塩基配列を有するプライマーの混合物である。

該2つのプライマーの混合物各々1.0μmol/L、ラット肺由来mRNAから作

製したcDNA 2 μ L、各成分を200 μ mol/Lずつ含有するdNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) の混合液、Taq Gold (パーキンエルマー社製)2.5単位および1 \times Taq Gold (Mg plus) 緩衝液(Perkin Elmer社製)を含む反応溶液50 μ Lを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラー PTC-200(MJリサーチ社製)を用い、95°Cで10分間加熱後、94°Cで1分間、60°Cで1分間の工程を1サイクルとして35サイクル行い、更に72°Cで8分間加熱した。

得られたPCR反応液より5 μ Lを分取し、アガロースゲル電気泳動により予想される約0.8kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従ってDNA断片を回収した。

上記で回収したDNA断片50ngとpT7Blue(R)T-Vector(Novagen社製)50ngとをDNA ligation kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpRpl1-2を得た。全塩基配列を決定した結果、プラスミドpRpl1-2には配列番号27に記載の塩基配列を有する約0.8kbのcDNAが含まれていた。該塩基配列によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号26に示す。該アミノ酸配列を、解析プログラム[GENETYX WIN ver.2.1(ソフトウェア社製)]を用いてヒト由来の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列と比較したところ、72.8%の一致が認められた。アライメント解析結果を第14図に示す。

実施例7 RT-PCR法を用いた発現解析

上記実施例5で決定したマウス由来の本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を基に配列番号28に記載の塩基配列を有する5'端側DNAプライマーと配列番号29に記載の塩基配列を有する3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。また上記実施例6で決定したラット由来の本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を基に配列番号30に記載の塩基配列を有する5'端側DNAプライマーと配列番号31に記載の塩基配列を有する3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。同様にcPLA₂ α の発現について解析するため、マウスcPLA₂ α の塩基配列情報(GenBank NM#008869)を基に配列番号32に記載の塩基配列を有する5'端側DNAプライマーと配列番号33に記載の塩基配列を有する3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。また、ラットcPLA₂ α の塩基配列情報(GenBank U38376)を基に配列番号34に記載の塩基配列を有する5'端側DNAプライマーと配列番号35に記載の塩基配列を有する3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。

コントロールとしてグリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ（以下、G3PDHと略記する）の発現を確認するため、マウスとラットのG3PDHの塩基配列情報(GenBank M32599、M17701)を基に配列番号36に記載の塩基配列を有する5'端側DNAプライマーと配列番号37に記載の塩基配列を有する3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。

2種類の組み合わせのプライマー(配列番号28と配列番号29、配列番号30と配列番号31、配列番号32と配列番号33、配列番号34と配列番号35および配列番号36と配列番号37の各組み合わせ)各々0.2 μ mol/L、マウスおよびラット各組織由来のmRNAから作製したcDNA 2 μ L、各成分を200 μ mol/Lずつ含有するdNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) の混合液、Taq Goldポリメラーゼ(パーキンエルマー社製)2.5単位および1×Taq Gold緩衝液 (Mg plus) を含む反応溶液20 μ Lを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラーPTC-200(MJリサーチ社製)を用い、95°Cで10分間加熱後、94°Cで30秒間、60°Cで30秒間の工程を1サイクルとしてcPLA₂ α および本発明のポリペプチドをコードするDNAについては29サイクル、G3PDHについては22サイクルを行い、更に72°Cで8分間加熱した。

得られたPCR反応液より10 μ Lを分取し、アガロースゲル電気泳動により予想される約500bpのDNA断片の増幅を確認した。電気泳動結果を第15図に示す。本発明のポリペプチドをコードするDNAについては肺、皮膚での強い発現が認められた。

実施例8 マウス由来の本発明のポリペプチドの昆虫細胞を用いた発現と該ポリペプチドのPLA₂活性の測定

(1) バキュロウイルス作製用プラスミドの構築

上記実施例5で得られたマウス由来の本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列情報をもとに配列番号40および配列番号41に記載の塩基配列を有するDNAプライマーを設計し、N末領域を以下の方法でPCRにより増幅した。

即ち、BALB/Cマウス皮膚由来のRNAより合成したcDNA 2 μ L、配列番号40および配列番号41記載の塩基配列を有するプライマー各々0.2 μ mol/L、各成分を200 μ mol/Lずつ含有するdNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) の混合液、Advantage 2 polymerase混合液(クロンテック社製)1 μ Lおよび1×Advantage 2 PCR緩衝液を含む反応溶液50 μ Lを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラー PTC-200(MJリサーチ社)を用い、95°Cで2分間加熱後、94°Cで30秒間、60°Cで30秒間、72°Cで30秒間の工程を1サイクルと

して32サイクル行なった後、72°Cで7分間の反応を行なった。PCR反応液をアガロースゲル電気泳動し約1.5kbのDNA断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従って精製した。

得られたDNA断片50ngとT7Blue T-Vector(Novagen社製)50ngとをDNA Ligation Kit Ver. 2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpN3を得た。

一方、該配列情報をもとに配列番号42および配列番号43に記載の塩基配列を有するDNAプライマーを設計し、C末領域を以下の方法でPCRにより増幅した。

即ち、BALB/Cマウス皮膚由来のRNAより合成したcDNA 2μL、配列番号42および配列番号43記載の塩基配列を有するプライマー各々0.2μmol/L、各成分を200μmol/Lずつ含有するdNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) の混合液、Advantage 2 polymerase混合液(クロントック社製)1μLおよび1×Advantage 2 PCR緩衝液を含む反応溶液50μLを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラー PTC-200(MJリサーチ社)を用い、95°Cで2分間加熱後、94°Cで30秒間、60°Cで30秒間、72°Cで30秒間の工程を1サイクルとして32サイクル行なった後、72°Cで7分間の反応を行なった。得られた反応液をフェノール抽出とエタノール沈殿の後、得られた沈殿を10mmol/Lトリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTTからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のApa I およびDra I(宝酒造社製)を加え、37°Cで3時間消化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、約1.4kbのDNA断片をQIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて精製した。

一方、プラスミドpBluescript II KS(-)(STRATAGENE社製) 2μgを33mmol/L トリス-酢酸(pH7.9)、10mmol/L 酢酸マグネシウム、0.5mmol/L DTT、66mmol/L 酢酸カリウム、0.01% BSAからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のSma I(宝酒造社製)を加えて30°Cで3時間消化反応を行なった。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、得られた沈殿を10mmol/Lトリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTTからなる緩衝液30μLに溶解し、10単位のApa I(宝酒造社製)を加えて37°Cで3時間消化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、約3.0kbのDNA断片をQIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて精製した。

得られたC末のPCR増幅Apa I -Dra I 断片(1.4kb)50ngと、プラスミドpBluescript II KS(-)由来のSma I -Apa I 断片(3.0kb)50ngとをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組

換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpC11を得た。

プラスミドpN3およびプラスミドpC11に含まれるDNA断片の塩基配列は常法によって決定し、それぞれの挿入されているDNA断片を挿入されている断片中のSmaI部位を用いて下記条件で連結した。

即ち、プラスミドpN3 2 μ gを33mmol/Lトリス-酢酸(pH7.9)、10mmol/L酢酸マグネシウム、0.5mmol/LDTT、66mmol/L酢酸カリウム、0.01%BSAからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のSmaI(宝酒造社製)を加えて30°Cで4時間消化反応を行なった。反応液をアガロースゲル電気泳動し約1.3kbのDNA断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて精製した。

一方、プラスミドpC11 2 μ gを33mmol/Lトリス-酢酸(pH7.9)、10mmol/L酢酸マグネシウム、0.5mmol/LDTT、66mmol/L酢酸カリウム、0.01%BSAからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のSmaI(宝酒造社製)を加えて30°Cで4時間消化反応を行なった。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、得られた沈殿を50mmol/Lトリス-塩酸(pH9.0)、1mmol/L塩化マグネシウムからなる緩衝液30M1に溶解し、0.5単位のアルカリホスファターゼ(宝酒造社製; *E.coli* C75由来)を加えて、60°Cで30分間脱リン酸化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてSmaI-アルカリホスファターゼ処理済み断片(4.4kb)を精製した。

得られたプラスミドpN3由来のSmaI断片(1.3kb)50ngと、プラスミドpC11由来のSmaI-アルカリホスファターゼ処理済み断片(4.4kb)とをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpN3+C11を得た。連結した塩基配列を配列番号39に示す。該塩基配列がコードするポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号38に示す。

該アミノ酸配列を、解析プログラム[GENETYX WIN ver.2.1(ソフトウェア社製)]を用いて配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するヒト由来の本発明のポリペプチドと配列番号22に示されるアミノ酸配列を有するマウス由来の本発明のポリペプチドと比較した。アライメント解析結果を第16図および17図に示す。

続いて、該塩基配列情報をもとに配列番号44および配列番号45に記載の塩基配列を有するDNAプライマーを設計し、Flagタグを挿入したN末領域をPCR増幅した。

即ち、プラスミドpN3 10ng、配列番号44および配列番号45に記載の塩基配列を有するプライマー各々0.2 μ mol/L、各成分を200 μ mol/Lずつ含

有するdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)の混合液、Advantage 2 polymerase混合液(Clontech社製)1μLおよび1×Advantage 2 PCR緩衝液を含む反応溶液50μLを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラー PTC-200(MJリサーチ社)を用い、95°Cで2分間加熱後、94°Cで30秒間、60°Cで30秒間の工程を1サイクルとして25サイクル行なった後、72°Cで7分間の反応を行なった。得られたPCR反応液をアガロースゲル電気泳動し約1.1kbのDNA断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従って精製した。

得られたDNA断片50ngとT7Blue T-Vector(Novagen社製)50ngとをDNA Ligation Kit Ver. 2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpMF11を得た。

プラスミドpMF11に含まれるDNA断片の塩基配列を常法によって決定し、BstXI部位を用いてプラスミドpN3+C11の挿入DNA断片と下記方法で連結した。

即ち、プラスミドpMF11 2μgを50mmol/L トリスー塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のBstXI(宝酒造社製)を加えて37°Cで3時間消化反応を行なった。得られた反応液をフェノール抽出とエタノール沈殿の後、得られた沈殿を33mmol/L トリスー酢酸(pH7.9)、10mmol/L 酢酸マグネシウム、0.5mmol/L DTT、66mmol/L 酢酸カリウム、0.01% BSAからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のSmaI(宝酒造社製)を加えて30°Cで3時間消化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し約0.8kbのDNA断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて精製した。

プラスミドpN3+C11 2μgを50mmol/L トリスー塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のBstXIおよびNotI(宝酒造社製)を加えて37°Cで7時間消化反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し約1.9kbのDNA断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて精製した。

一方、プラスミドpVL1393(PharMingen社製) 2μgを50mmol/L トリスー塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のNotI(宝酒造社製)を加えて37°Cで3時間消化反応を行なった。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、得られた沈殿を33mmol/L トリスー酢酸(pH7.9)、10mmol/L 酢酸マグネシウム、0.5mmol/L DTT、66mmol/L 酢酸カリウム、0.01% BSAからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のSmaI(宝酒造社製)を加えて30°Cで3時間消化

反応を行なった。得られた反応液をアガロースゲル電気泳動し、約9.6kbのDNA断片をQIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて精製した。

得られたプラスミドpMF11由来のSma I -BstXI断片(0.8kb)50ngとプラスミドpN3+C11由来のBstXI-Not I断片(1.9kb)50ngおよびpVL1393由来のSma I -Not I断片(9.6kb)50ngとをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpmPLAH-1393を得た。該プラスミドの構築過程および制限酵素地図を第18図に示す。

(2) 組み換えバキュロウイルスの作製

ウイルスの作製はバキュロウイルス発現ベクターシステムマニュアル(PharMingen社製)に記載されている方法に従って行なった。

即ち、 2×10^6 個のSf9細胞を直径6cmシャーレに播種し、接着後、無血清培地(Sf-900 II SFM、ライフテック社製)に交換した。上記(1)で作製したプラスミドpmPLAH-1393またはpVL1393 5μg、Linealized Baculogold DNA(PharMingen社製)15ng、リポフェクチン液(ライフテクノロジー社製)6ngを含むDNAリポフェクチン混合液24μLを、上記の無血清培地の入ったシャーレに均一になるように添加し27°Cで4日間培養した。血清入りの培地(Esf921、旭テクノガラス社製)を2mL添加し、さらに27°Cで3日間培養した。細胞を回収後、800rpm、5分間遠心分離して上清を得た。得られた上清を、接着させたSf9細胞に添加し、27°Cで3日間培養した。細胞を回収後、800rpm、5分間遠心分離してウイルスを含有する上清を得た。

(3) 昆虫細胞可溶性画分の調製

1.5×10^6 個/mLの浮遊Sf9細胞28mLに(2)で回収したウイルスを含有する上清 2mLを添加し浮遊状態で27°Cで4日間培養した。800rpm、5分間の遠心分離により細胞を回収し、PBSにて細胞を洗浄した。25mmol/L トリス-塩酸(pH 7.5)、140mmol/L 塩化ナトリウム、5mmol/L 塩化カリウム、2mmol/L EDTA、1x complete, EDTA-free(ベーリンガーマンハイム社製)からなる緩衝液に得られた細胞を懸濁し、超音波破碎機を用い氷上で細胞を破壊した。上記抽出液を15,000rpmで15分間遠心分離し、上清をPLA₂活性の測定に用いた。

(4) PLA₂活性の測定

1 - パルミトイル - 2 - [1 - ¹⁴C] アラキドニル-ホスファチデルコリン(第一化学薬品株式会社より入手。48mCi/mmol)(2μmol/L)および上記で得られた上清を含有する100μLの反応液[100mmol/L トリス-塩酸(pH7.5)、8mmol/L 塩化カルシウム、1mg/mL BSA(実質的に脂肪酸を含まない。シグマ社製)、8μmol/L トリトンX-100]を37°Cで30分インキュベート

した後、ドール試薬（2 - プロパノール／ヘプタン／硫酸、78: 20: 2）を添加して反応を停止した。カルシウム濃度依存性の検討は、0、1、2、4、8、16mmol/Lの塩化カルシウム濃度で行なった。時間依存性の検討は、反応時間を0、2、5、10、30、60、90分とした。

さらにヘプタン0.3mLおよび水0.2mLを加え、旋回して混合した。得られた混合物を3,000rpmで5分間遠心分離し、得られた上層のうち0.32mLをシリカゲル（Silica gel 60、メルク社製）40mgを含有するチューブに移し、ヘプタン0.3mLを添加した。チューブを旋回して混合した後、3,000rpmで5分間遠心分離した。得られた上清のうち400μLを、ウルチマゴールド（Packard社製）3mLを入れたシンチレーションバイアルに移し、液体シンチレーションカウンター（Beckman LS6500）を用いて放射活性を測定した。ポリペプチドの量は、Bio Rad Protein Assay法を用いて定量した。

コントロールとしてプラスミドpVL1393から作製したウイルスを導入した昆虫細胞の可溶性画分を用いた。ポリペプチド量依存性の検討結果を第19図、カルシウム濃度依存性の検討結果を第20図、反応時間の検討結果を第21図に示す。

以上の結果から、上記実施例5で得られたマウス由来の本発明のポリペプチドは1 - パルミトイ - 2 - ホスファチヂルコリンのs n - 2位のエステル結合をカルシウム濃度依存的に加水分解するPLA₂活性を有することが明らかとなった。

実施例9 RT-PCR法を用いた細胞株での発現解析

ヒトcPLA₂αの塩基配列の情報(GenBank ACCESSION M68874)を基に配列番号46に示される塩基配列を有する5'端側DNAプライマーと配列番号47に示される塩基配列を有する3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。

2種類のプライマー(配列番号46と配列番号47)各々0.2μmol/L、株化されたヒト培養細胞(K-562、HL-60、Jurkat、293EBNA、DU145、PC-3、LNCaP.FGS)のRNAから作製したcDNA 2μL、各成分を200μmol/Lずつ含有するdNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)の混合液、Taq Goldポリメラーゼ(パーキンエルマー社製)2.5単位および1×Taq Gold (Mg plus) 緩衝液を含む反応溶液20μLを用い、下記条件下でヒトcPLA₂α cDNA断片のPCR增幅を行なった。

即ち、サーマルサイクラーPTC-200(MJリサーチ社製)を用い、95°Cで10分間加熱後、94°Cで30秒間、60°Cで30秒間の工程を1サイクルとして30サイクル行ない、更に72°Cで8分間加熱した。

得られたPCR反応液より10μLを分取し、アガロースゲル電気泳動により予想される約0.6kbのDNA断片の増幅を確認した。

同様にヒト由来の本発明のポリペプチドをコードするDNAのcDNA断片のPCR増幅を行なった。即ち、2種類のプライマー(配列番号13と配列番号14)各々0.2μmol/L、株化されたヒト培養細胞(K-562、HL-60、Jurkat、293EBNA、DU145、PC-3、LNCaP.FGS)のRNAから作製したcDNA 2μL、各成分を200μmol/Lずつ含有するdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)の混合液、Taq Goldポリメラーゼ(パーキンエルマー社製)2.5単位および1×Taq Gold(Mg plus)緩衝液を含む反応溶液20μLを用い、95℃で10分間加熱後、94℃で30秒間、60℃で30秒間の工程を1サイクルとして30サイクル行ない、更に72℃で8分間加熱した。

得られたPCR反応液より10μLを分取し、アガロースゲル電気泳動により予想される約0.6kbのDNA断片の増幅を確認した。

コントロールとして、G3PDH cDNA断片のPCR増幅を行なった。即ち、2種類のプライマー(配列番号36と配列番号37)各々0.2μmol/L、株化されたヒト培養細胞(K-562、HL-60、Jurkat、293EBNA、DU145、PC-3、LNCaP.FGS)のRNAから作製したcDNA 2μL、各成分を200μmol/Lずつ含有するdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)の混合液、Taq Goldポリメラーゼ(パーキンエルマー社製)2.5単位および1×Taq Gold(Mg plus)緩衝液を含む反応溶液20μLを用い、95℃で10分間加熱後、94℃で30秒間、60℃で30秒間の工程を1サイクルとして21サイクル行ない、更に72℃で8分間加熱した。

得られたPCR反応液より10μLを分取し、アガロースゲル電気泳動により予想される約0.5kbのDNA断片の増幅を確認した。

ヒト由来の本発明のポリペプチドはPC-3およびLNCaP.FGS細胞でmRNAの発現が認められた。電気泳動の結果を第22図に示す。

実施例10 ノーザンハイブリダイゼーションによるヒト由来の本発明のポリペプチドのヒト胎児組織での発現の解析

実施例3で作製したディゴキシゲニン標識cRNAプローブを用いて、実施例3と同様の方法でヒト胎児心臓、腎臓、皮膚、小腸および成人肺のpoly(A)⁺RNAフィルター[Human Fetal Normal Tissue mRNA Northern Blot II(Biochain社製)]に対してノーザンハイブリダイゼーションを行なった。

結果を第23図に示す。胎児腎、皮膚および成人肺において約3.5キロヌクレオチドおよび6キロヌクレオチドのバンドが認められた。

産業上の利用可能性

本発明により得られる新規ホスホリパーゼA₂ポリペプチドのDNAを用いることにより、喘息、虚血性疾患、関節炎、リウマチ、敗血症、皮膚の炎症、動脈硬化、痛み、パーキンソン氏病、アルツハイマー病、悪性腫

瘡、腎炎、糖尿病、虚血再灌流障害の疾患の診断、予防、治療ができる。

配列表フリー テキスト

配列番号 5 - 人工配列の説明 : 合成 R N A
配列番号 6 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 7 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 8 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 9 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 10 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 11 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 12 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 13 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 14 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 16 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 17 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 18 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 19 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 20 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 21 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 24 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 25 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 28 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 29 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 30 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 31 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 32 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 33 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 34 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 35 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 36 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 37 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 40 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 41 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 42 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 43 - 人工配列の説明 : 合成 D N A
配列番号 44 - 人工配列の説明 : 合成 D N A

配列番号 4 5 - 人工配列の説明 : 合成 D N A

配列番号 4 6 - 人工配列の説明 : 合成 D N A

配列番号 4 7 - 人工配列の説明 : 合成 D N A

請求の範囲

1. 配列番号 1、22、26 および 38 記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド。
2. 配列番号 1、22、26 および 38 記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホリバーゼ A₂活性を有するポリペプチド。
3. 配列番号 1、22、26 および 38 記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列と 60 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつホスホリバーゼ A₂活性を有するポリペプチド。
4. 請求項 1 ~ 3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA。
5. 配列番号 2、23、27 および 39 記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有する DNA。
6. 配列番号 2、23、27 および 39 記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列の相補配列からなる DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする DNA であり、かつホスホリバーゼ A₂活性を有するポリペプチドをコードする DNA。
7. 請求項 4 ~ 6 いずれか 1 項に記載の DNA を含む組換えベクター。
8. 請求項 7 記載の組換えベクターを保有する形質転換体。
9. 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞からなる群から選ばれる形質転換体である、請求項 8 記載の形質転換体。
10. 微生物が、Escherichia 属に属する微生物である、請求項 9 記載の形質転換体。
11. 微生物が、Escherichia coli JM109/p5269+C5(FERM BP-7281)である、請求項 9 記載の形質転換体。
12. 請求項 8 ~ 11 いずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にホスホリバーゼ A₂活性を有するポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、ホスホリバーゼ A₂活性を有するポリペプチドの製造方法。
13. 請求項 4 ~ 6 いずれか 1 項に記載の DNA の塩基配列中の連續した 5 ~ 60 塩基と同じ配列を有するセンスオリゴヌクレオチド、該センスオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびこれらセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体からなる群から選ばれるオリゴヌクレオチド。
14. 配列番号 13、14、28、29、30、31、46 および 47

記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

15. オリゴヌクレオチド誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN_{3'} - P_{5'}ホスホアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体からなる群から選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、請求項13に記載のオリゴヌクレオチド。

16. 請求項13～15いずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法。

17. 請求項13～15いずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

18. 請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドを認識する抗体。

19. 請求項18記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

20. 請求項18記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドの免疫組織染色法。

21. 請求項18記載の抗体を含有する免疫組織染色剤。

22. 請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、該ポリペプチドの有するホスホリパーゼA₂活性を測定することを特徴とする、該ポリペプチドの有するホスホリパーゼA₂活性を変動させる化合物のスクリーニング方法。

23. 請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、該ポリペプチドの発現量を検出することを特

徴とする、該ポリペプチドの発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

24. 該ポリペプチドの発現量の検出が、請求項16記載の方法を用いる請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドをコードするmRNAの検出である、請求項23記載のスクリーニング方法。

25. 該ポリペプチドの発現量の検出が、請求項19に記載の方法を用いるポリペプチドの検出である、請求項23記載のスクリーニング方法。

26. 請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドの有するホスホリバーゼA₂活性の変動が、該ポリペプチドの有するホスホリバーゼA₂活性の向上である、請求項22記載のスクリーニング方法。

27. 請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドの有するホスホリバーゼA₂活性の変動が、該ポリペプチドの有するホスホリバーゼA₂活性の減少である、請求項22記載のスクリーニング方法。

28. 請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドの発現の変動が、該ポリペプチドの発現量の向上である、請求項23～25いずれか1項に記載のスクリーニング方法。

29. 請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドの発現の変動が、該ポリペプチドの発現量の減少である、請求項23～25いずれか1項に記載のスクリーニング方法。

30. 請求項22～29いずれか1項に記載の方法により得られる化合物。

31. 請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写を制御するプロモーターDNA。

32. 請求項31記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写効率を変動させる化合物のスクリーニング方法。

33. レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、β-ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、β-グルクロニダーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子からなる群から選ばれる遺伝子である、請求項32記載のスクリーニング方法。

34. 請求項1～3いずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写効率の変動が、該DNAの転写効率の向上である、請求項32または33記載の方法。

35. 請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA の転写効率の変動が、該 DNA の転写効率の減少である、請求項 3 2 または 3 3 記載の方法。

36. 請求項 3 2～3 5 記載の方法により得られる化合物。

37. 請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドが有するアミノ酸配列において、該ポリペプチド活性ドメイン部位の一部または全部のアミノ酸配列を欠失したポリペプチド。

38. 配列番号 3 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

39. 配列番号 3 記載のアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホリバーゼ A₂活性を阻害する活性を有するポリペプチド。

40. 配列番号 3 記載のアミノ酸配列と 6.0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつホスホリバーゼ A₂活性を阻害する活性を有するポリペプチド。

41. 請求項 3 7～4 0 いずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA。

42. 配列番号 4 記載の塩基配列を有する DNA。

43. 配列番号 4 記載の塩基配列の相補配列からなる DNA とストリングエントな条件下でハイブリダイズする DNA であり、かつホスホリバーゼ A₂活性を阻害する活性を有するポリペプチドをコードする DNA。

44. 請求項 4 1～4 3 いずれか 1 項に記載の DNA を含む組換えベクター。

45. 請求項 4 4 記載の組換えベクターを保有する形質転換体。

46. 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞からなる群から選ばれる形質転換体である、請求項 4 5 記載の形質転換体。

47. 請求項 4 5 または 4 6 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にホスホリバーゼ A₂活性を阻害する活性を有するポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、ホスホリバーゼ A₂活性を阻害する活性を有するポリペプチドの製造方法。

48. 請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドのホスホリバーゼ活性を変動させる化合物を有効成分とする、該ポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

49. 請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドを有効成分として含有する、該ポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

50. 請求項 4～6 いずれか 1 項に記載の DNA を有効成分として含有する、請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドが関与する疾患

の診断、予防または治療のための医薬。

51. 請求項 37～40 いずれか 1 項に記載のポリペプチドを有効成分として含有する、請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

52. 請求項 41～43 いずれか 1 項に記載の DNA を有効成分として含有する、請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

53. 請求項 13～15 いずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する、請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

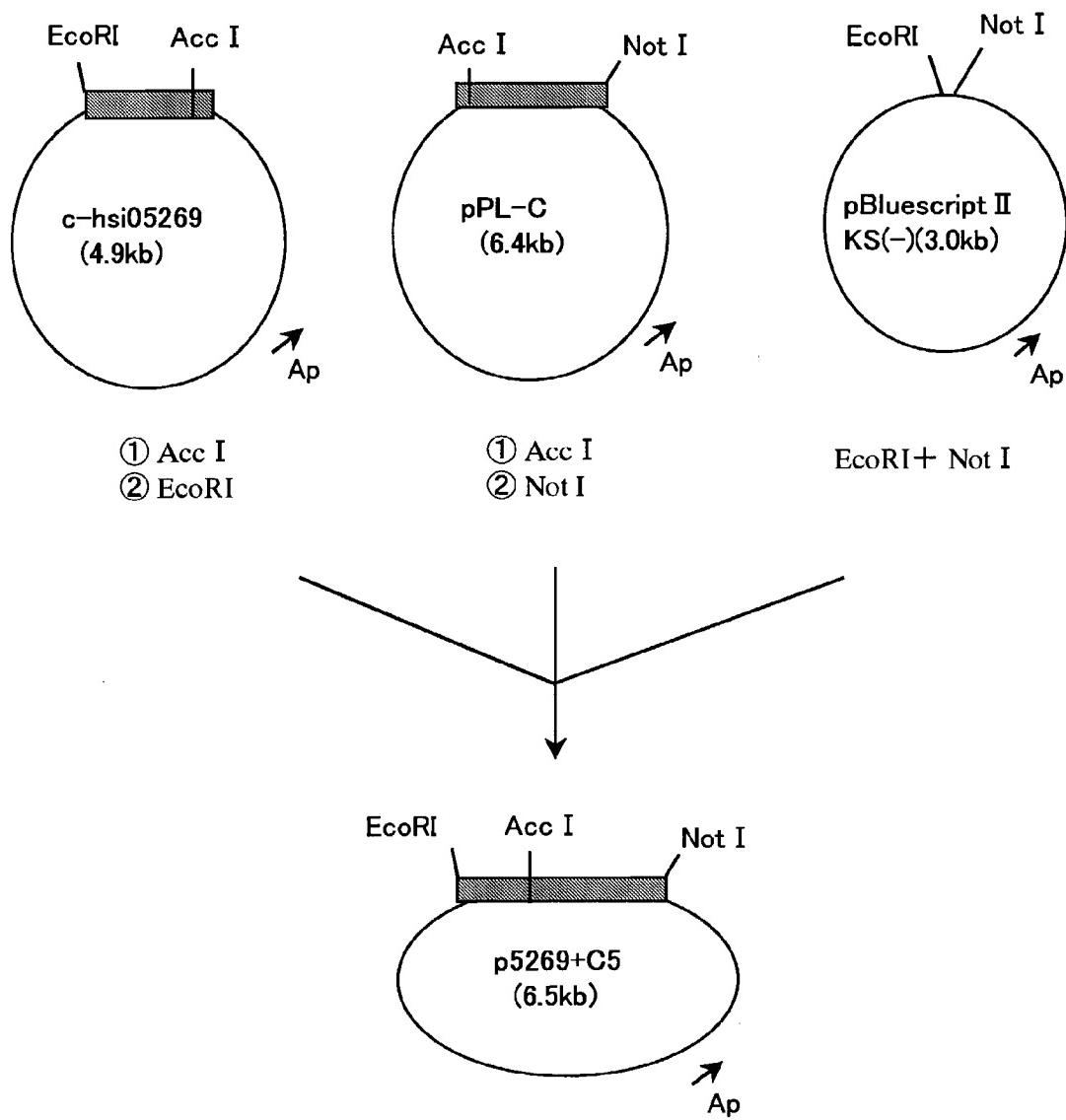
54. 請求項 18 記載の抗体を有効成分として含有する、請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

55. 請求項 30 または 36 記載の化合物を有効成分として含有する、請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドが関与する疾患の診断、予防または治療のための医薬。

56. 該ポリペプチドが関与する疾患が、喘息、虚血性疾患、関節炎、リウマチ、敗血症、皮膚の炎症、動脈硬化、痛み、バーキンソン氏病、アルツハイマー病、悪性腫瘍、腎炎、糖尿病または虚血再灌流障害の予防または治療のための医薬である、請求項 48～55 いずれか 1 項に記載の医薬。

57. 請求項 28 または 34 記載の方法により得られる化合物を有効成分として含有する、糖尿病の診断、予防または治療のための医薬。

1/21



第1図

2/21

121 :	GSDQLSLLLFDLRLSLKCCQPHKHTFPLNHQDSQELQVEFVLEKSQVPASEVITNGVLVAH	
113 "	MSFIDPYQHIV	1"
181 '	PCLRIQGTLRGDGTAPEEYGSQQLQAVPGAYEKPQLLPLQPTEPGLPPTFTFHVNPV	
133 "	EHQYSHKFKTVVVLRATKVTKGAFGMDLDTPDPY--VELFIISTTPDSRKRTRHFNNDINPV	
241 '	LSSRLHVEMELLAAVQSGPSTELE-AQTSKLGEGGILLSSLPLGQEEQCSVALGEQEV	
71 "	WNETPEFIFLDPNQENVLEITIMDANYVMDETLGTTATFTVSSMKVGEEKKEVPPFIFNQVTM	
300 '	ALSMKVEMSSGDLDLRLCGFDLSDGEQEFLDRRKQVVSKALQQVLC--LSEALDSG-QVPV	
131 "	VLEMSLEVCSGP-DLRFSSMALCDQEKTFRQQRKEHIRESMKKLLGPKNSEGGLHSARDVPU	
357 '	VAVLGSGGGTRAMSSLYCSLAGLQELGLLDTVTYLSGV <u>SGST</u> WCISTLYRDPAWSQVALQ	
190 "	VAILGSGGGFRAMVGFSGVMKALYESGILDCAVAGLSGSTWYMSTLYSHPDFPEKGPE	
417 '	PIERAQVHVCSKMGALSTERLYQYTQELGVRSRSGHSVSLIDLWGLLVEYLLYQEENP	
250 "	EINEEMLKNVSHNPLLLLTPQKVKRVESLWKKSSGQPVTFDIFGMLIGETLILHNRMN	

第2図

3/21

第3図

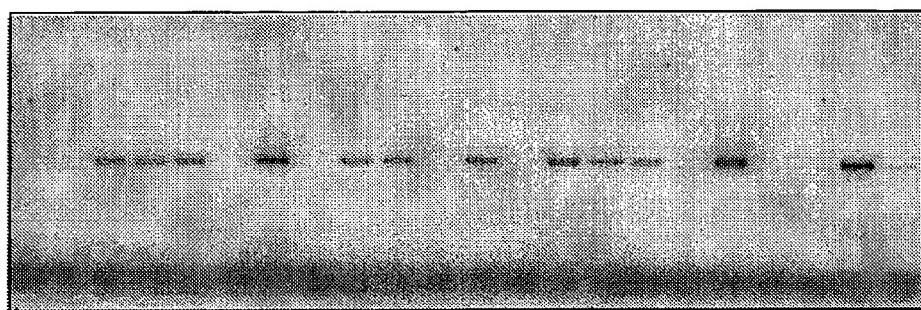
4/21

第4図

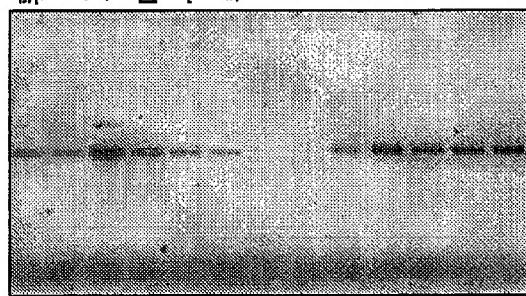
5/21

6/21

一 副腎 脳、線条体
胎盤 脳、海馬
前立腺 脳、黒質
唾液腺 脳、視床
骨格筋 腎臓
脊髓 下垂体
脾臓 小腸
胃 骨髓
精巢 脳、扁桃
胸腺 脳、小腦
甲狀腺 脳、脳梁
氣管 胎兒脳
子宮 胎兒腎
心臓 胎兒肝臓
肝臓 胎兒肺
肺 リンパ節

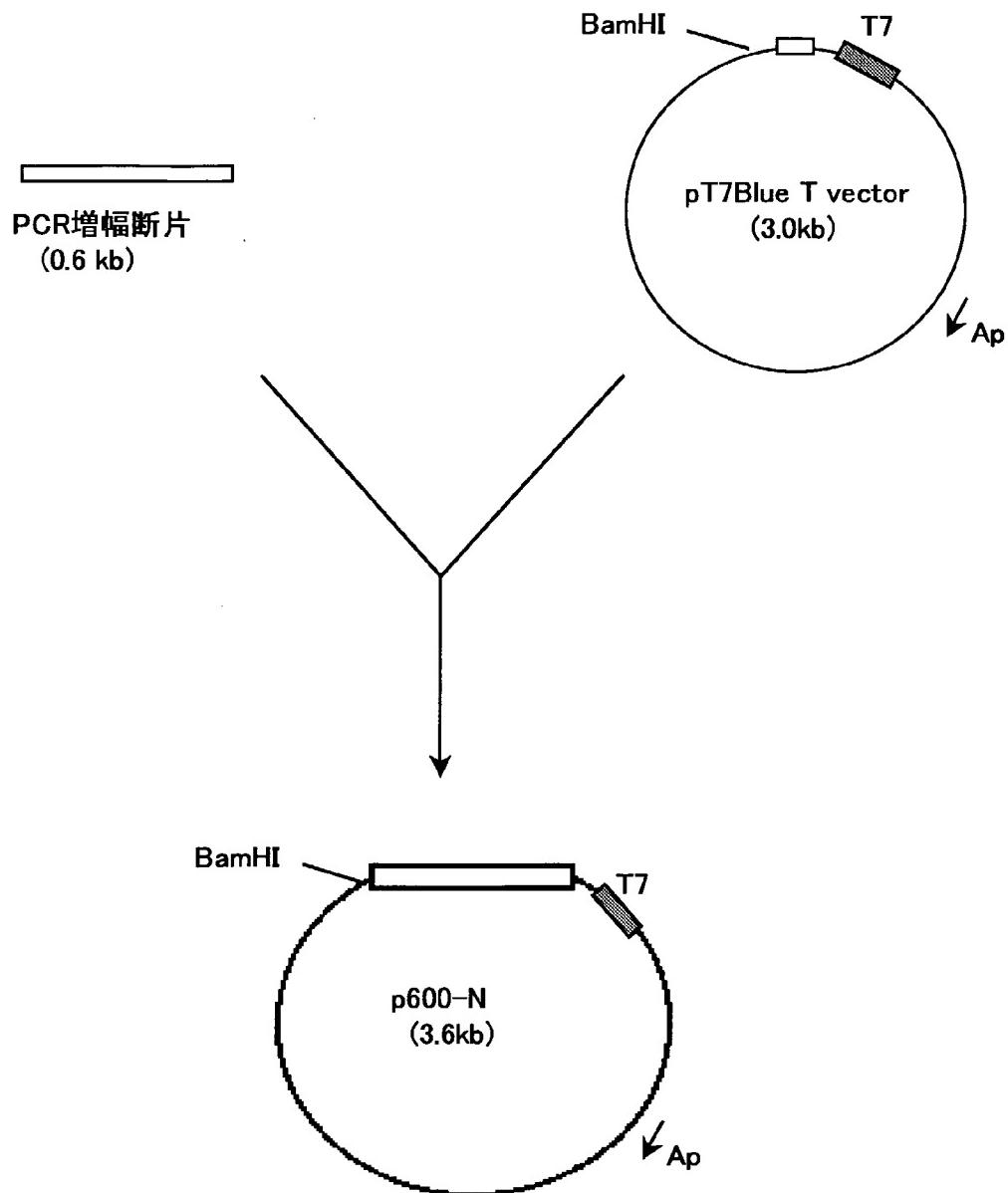


乳腺 胎盤 前立腺 唾液腺
骨格筋 脊髓 脾臓 胃
胃 精巢 胸腺 甲狀腺
氣管 子宮



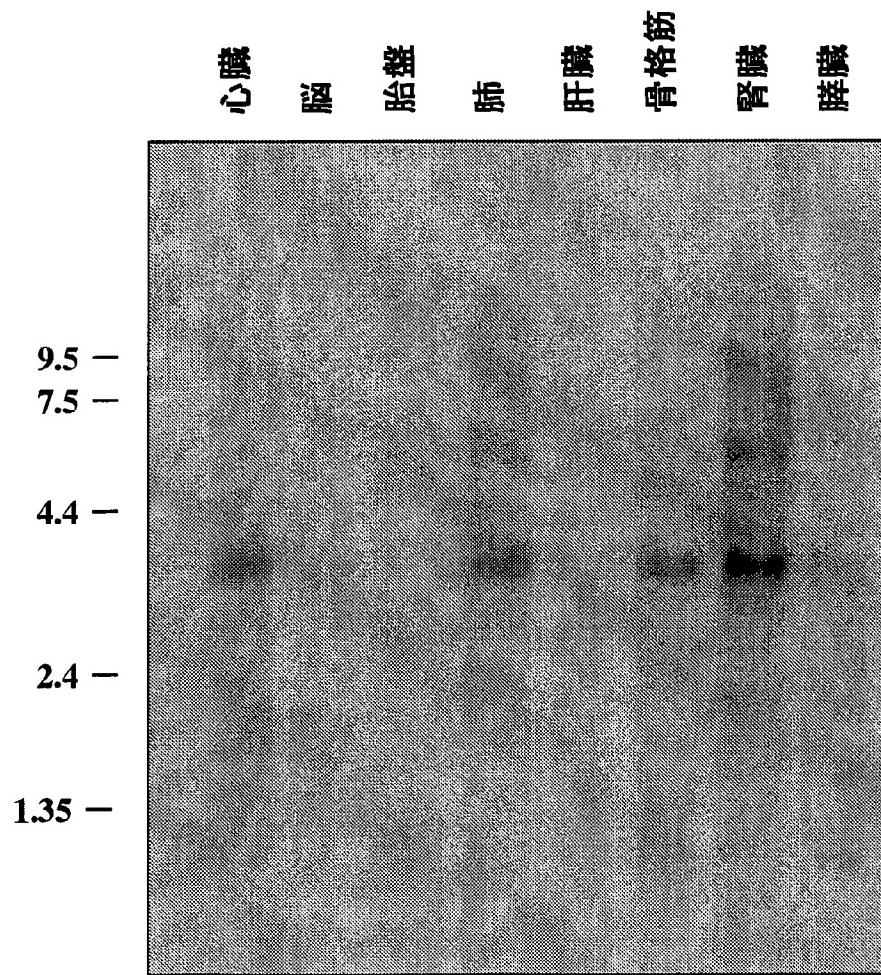
第6図

7/21



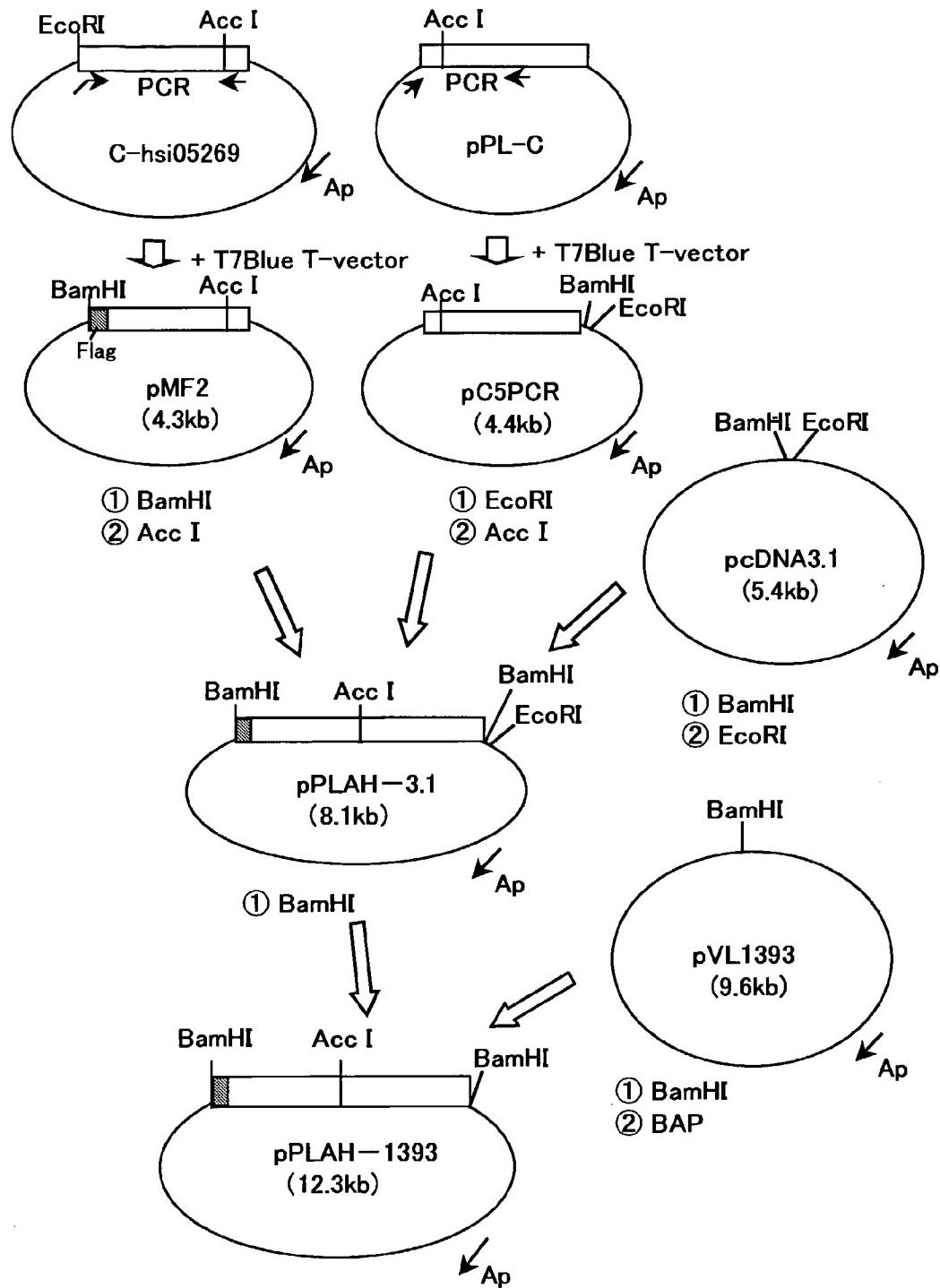
第7図

8/21



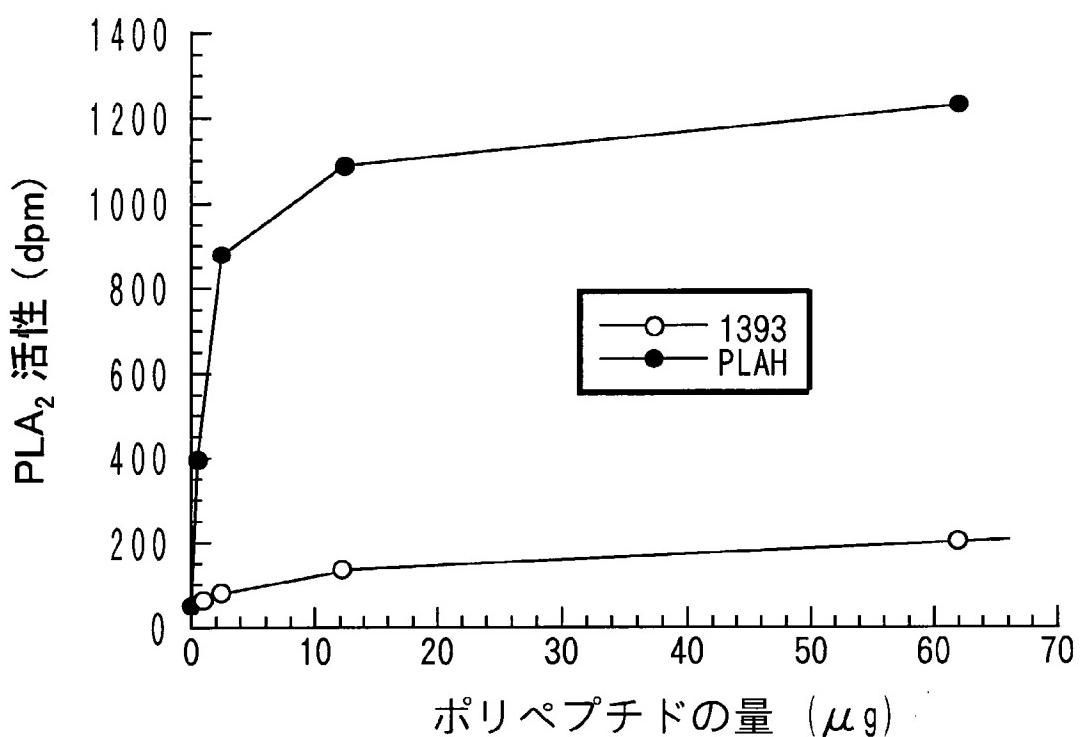
第8図

9/21



第9図

10/21



第10図

11/21

241 · LSSRLHVELM ELLAAVQSGP STELEAQTSK LGEGGILLSS LPLGQEEQCS VALGEQQEVA	*** . * . * . * . *** . * . *** . * . *** . * . *** . * . *** . * . *** . *
237 " LSPKLHIKLO EOLOVVFHSGP SDELEAQTSK MDKASILLSS LPLNEELTKL VDLEEGOOVT	

360' LGSGGTRAM SSLYGSLAGL QELGLLDVT YLSGVSSGSTW CISTLYRDPA WSQVALQGPI
***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** .
357" LGSGGTRAM TSLYGSLAGL QELGLLDAVT YLSGVSSGSSW CISTLYRDPS WSOKALLOGPI

420' ERAQVHVCSS KMGALSTERL QYYTQELGVR ERSGHSSVSLI DLWGLLVEYL LYQEENPAKL
417" KYASERVCSS KIGMLSPKOF EYYSREKKRAW ESRGHSSMSET DLWGLTIEYF LNOEENPAKL

第12図

13/21

540'	FMGRLLQLQP	EPRICYLQGM	WGSAGFATS	LD EIFLKTAGSG	LSFLEWYRG	VNITDDCQKP
* * * * *	. . * * * * *	* * * * * . * *	* * * * * . * *	* * * * * . * *	* . * * *	* . * * *
537"	FMGRLLHFWP	EPRICYLQGM	WGSAGFAASLY	EIFLKLGG	LSFLDWHRG	VSVTDDWPKL
600'	QLHNPSRLRT	RLLTPQGPFS	QAVALDIFTSR	FTSAQSFnFT	RGLCLHKDYV	AGREF-----V
* . * . * . *	* . * . *	* . * . *	* . * . *	* . * . *	* . * . *	* . * . *
597"	RKQDPTRLPT	RLFTPMSSES	QAVALDIFTSR	ITCAQTFNFT	RGLCMYKDYT	ARKDFVVSED
656'	AW---KDTHP	DAFPNQLTPM	RDCLYLVDGG	FAINSPFPLA	LLPQRAVDLI	LSFDYSLEAP
* *	. . *	* . * . *	. *	* . * . *	* . * . *	* . * . *
657"	AWHSHNYGYP	DACPQNLTPM	KDFLSLVDGG	FAINSPFPLV	LQPQRAVDLI	VSFDYSLEG
713'	FEVLKMTEKY	CLDRGIPFPS	IEVGPEDVEE	ARECYLFAKA	EDPRSSPIVLH	FPLVNRTFR
* * * * .	* . * . *	* . * . *	* . * . *	* . * . *	* . * . *	* . * . *
717"	FEVLQVTEKY	CRDRGIPFFPR	IEVDPKDSED	PRECYLFTEA	EDPCSPIVLH	FPLVNRTFR
773'	HLAGVERQT	AEEKAFGDFV	INRPDTPYGM	MNFTYEPODF	YRLVALSRYN	VLNNTETLKC
* * * * *	* . * . *	* . * . *	* . * . *	* . * . *	* . * . *	* . * . *
777"	HLAGVERQT	AEEKAFGDFI	INGPDTAYGM	MDFTYEPEKF	DRLVTLSRYN	VLNNKETIRH
833'	ALQLALD-RH	QARERAGA				
* * * * *	* .	* . * . *				
837"	ALQLALDRRR	QAGGRVGG				

14/21

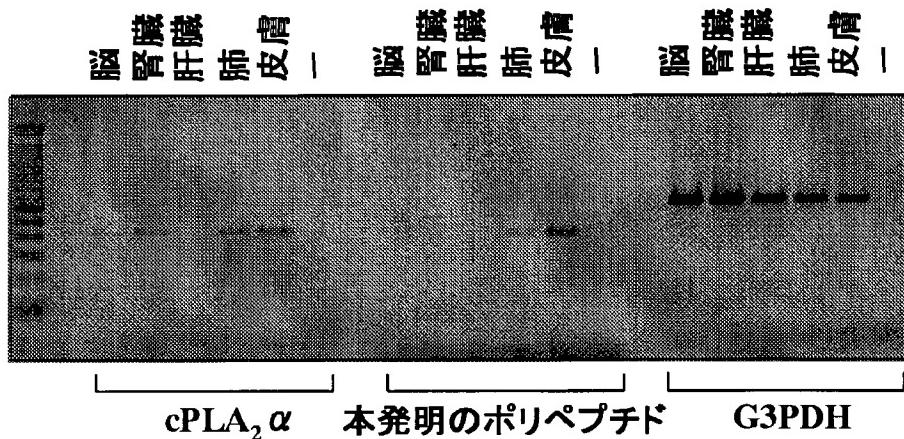
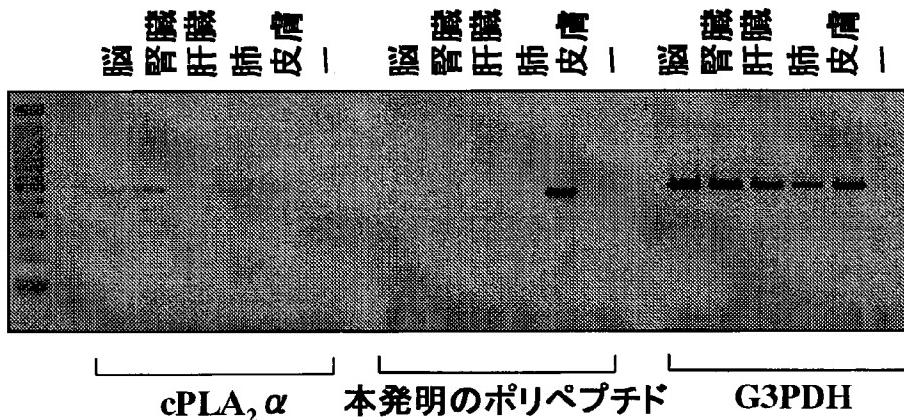
61' KSFSSKAVALD IFTSRFTCAQ SFNFTRGLCL HKDYVAGREF VAWKDT-HPD AF-----PN
61" QGPFSSQAVLD IFTSRFTSAQ SFNFTRGLCL YKDYTARKDF VVSEDAWHSD NYKHLDAACPN

114"	QLTPMRDCLY LVDGGFAINS PFPLALLPQR AVDLILSFDY SLEAPFEVLK MTEKYCLDRG
121'	QLTPMKDFLS LVDGGFAINS PFPLILQPQR AVDLIVSFDY SLEAPFEVLO VTEKYCRDRG

241: FGDFIINGPD TAYGMMNFTY E
***** . ** * * . *****

234" FGDFVINRPD TPYGMMNFTY E

15/21

マウスラット

第15図

16/21

474 : ENPAKLSDQQEAVRQGQNPNPPIYTSVNVRTNLSGED-FAEWCEFTPYEVGFPKYGAYVPT 532
471 : ENPAKLSDQQETVSQGQNPNPPIYASINVHKNISG-DYFAEWCEFTPYEVGFPKYGIVVPT 529
470 : ENPAKLSDQQETVSQGQNPNPPIYASINVHKNISGDD-FAEWCEFTPYEVGFPKYGAYVPT 528

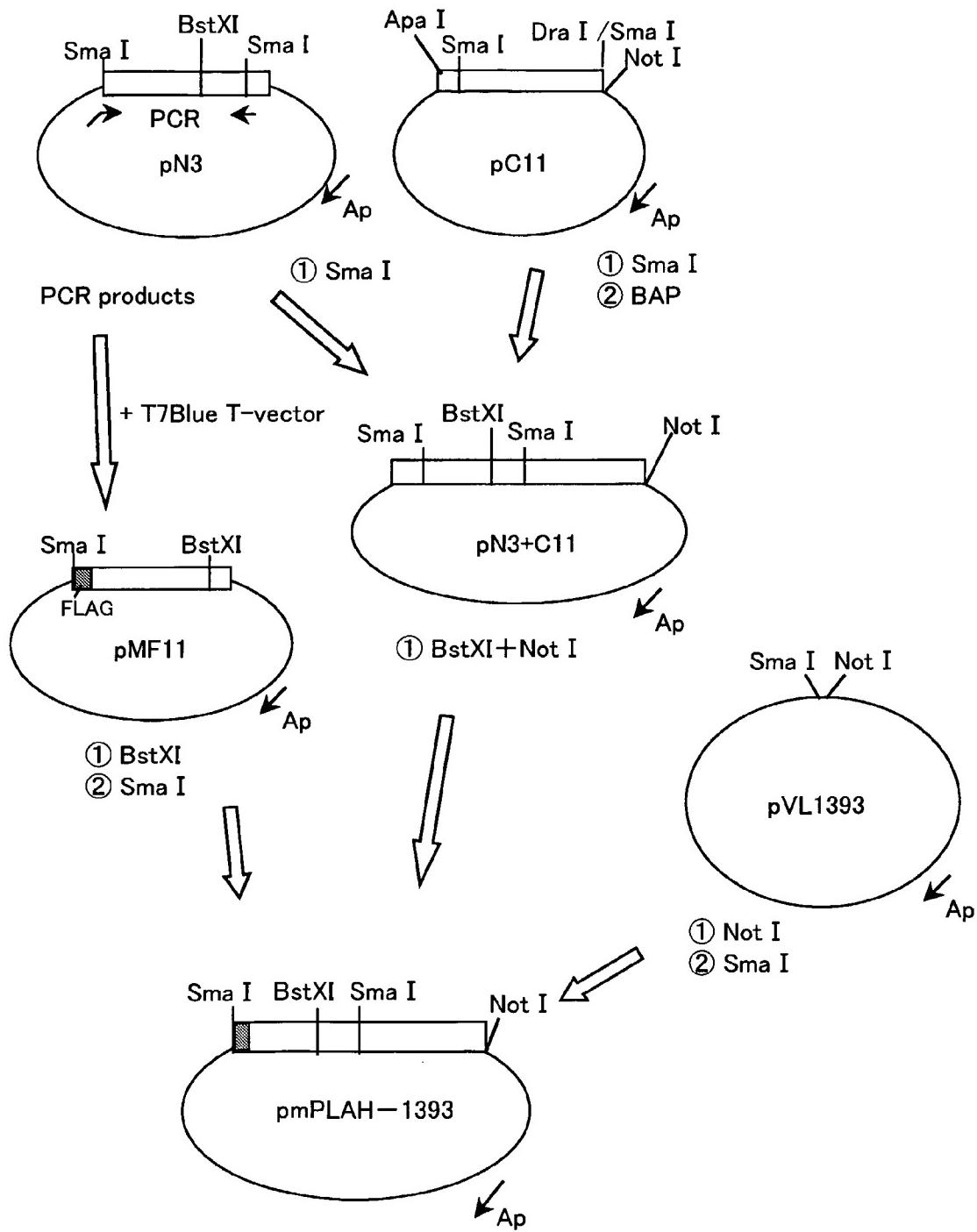
533 : ELFGESELFMRLLQ-LQPEPRICYLQGMWGSAAFATS-LDEIFLKTAGSGLSFLWEYRGSV 590
530 : ELFGESEFFMRLLHFW-PEPRICYLQGMWGSAAFAASLY-EIFLKLGGLSFLDWHRGSV 587
529 : ELFGESEFFMRLLHFW-PEPRICYLQGMWGSAAFAASLY-EIFLKLGGLSFLDWHRGSV 586
***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** *

696 : QRAVDLILSF DYSLEAPFEV LKTEKYCLDRGIPFPSIEVG PEDVEARECYL FAKAEDP 755
700 : QRAVDLIVSF DYSLEGPFEV LQVTEKYCRDRGIPFPRIEV DP KDS EDPRECYLF TEAEDP 759
699 : QRAVDLIVSF DYSLEGPFEV LQVTEKYCRDRGIPFPRIEV DP KDS EDPRECYLF TEAEDP 758
***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** .
***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** .
***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** .
***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** .

816 : VALSRYNVLNNTVETILKCALQLALDRHQ-ARERAGA	849
820 : VTLSRYNVLNNTKETIRHALQLALDRRRQAGGRVGG	854
819 : VTLSRYNVLNNTKETIRHALQLALDRRRQAGGRVGG	853

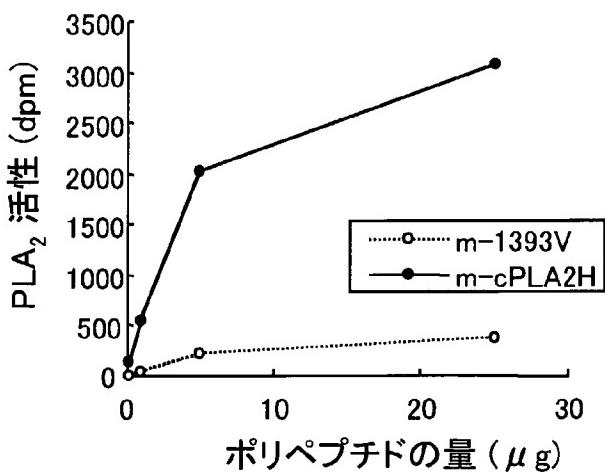
* *

18/21

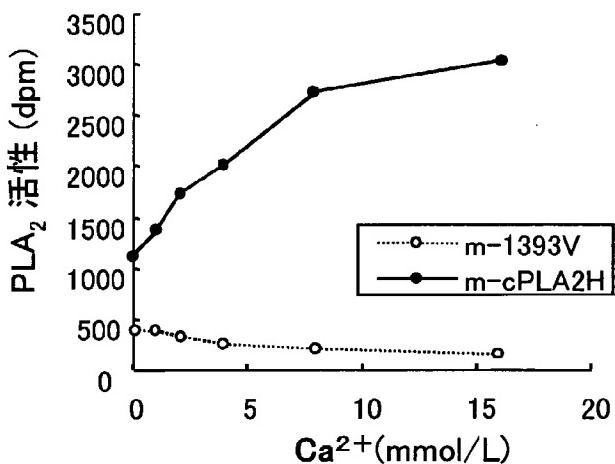


第18図

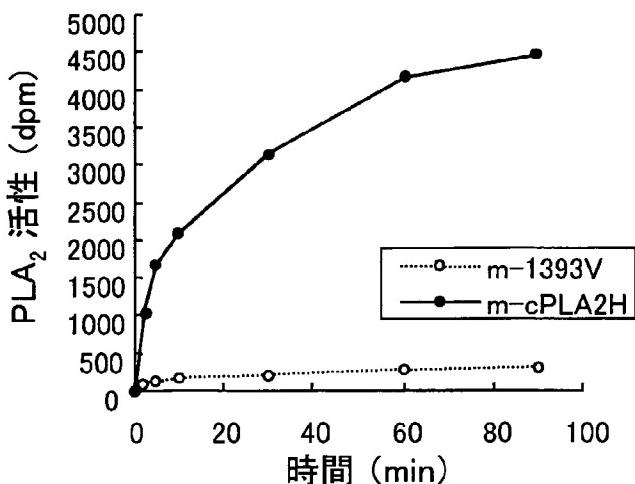
19/21



第19図

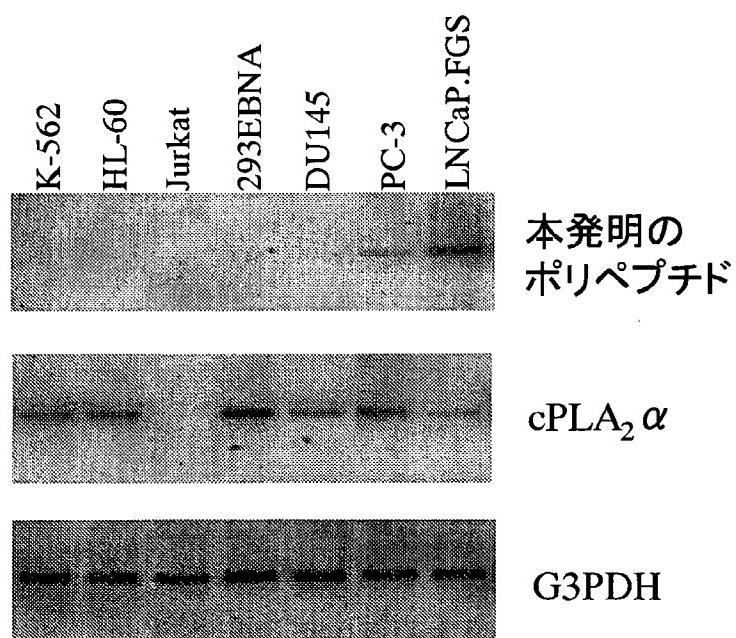


第20図



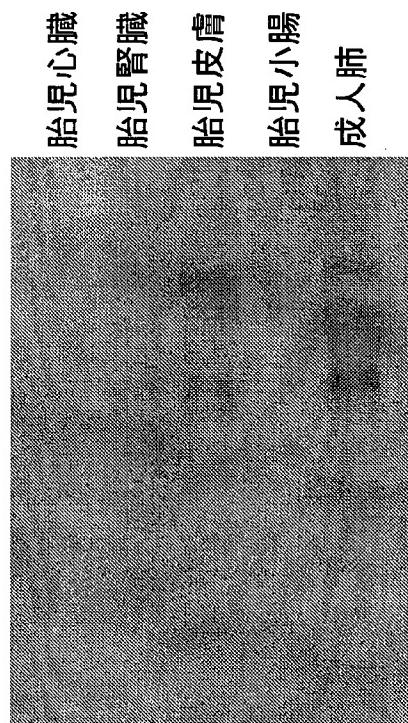
第21図

20/21



第22図

21/21



第23図

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Novel polypeptide having phospholipase A₂ activity

<130> 11340W01

<150> JP 00/146466

<151> 2000-09-19

<150> JP 01/284044

<151> 2001-05-16

<160> 47

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 849

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Trp Ala Leu Trp Pro Arg Trp Leu Ala Asp Lys Met Leu Pro
1 5 10 15

Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Gln Lys Arg Glu Lys Arg Gly Pro Leu
20 25 30

Trp Arg His Trp Arg Arg Glu Thr Tyr Pro Tyr Tyr Asp Leu Gln Val
35 40 45

Lys Val Leu Arg Ala Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asp Leu Leu Ser Lys
50 55 60

Ala Asp Cys Tyr Val Gln Leu Trp Leu Pro Thr Ala Ser Pro Ser Pro

2/52

65 70 75 80

Ala Gln Thr Arg Ile Val Ala Asn Cys Ser Asp Pro Glu Trp Asn Glu
85 90 95Thr Phe His Tyr Gln Ile His Gly Ala Val Lys Asn Val Leu Glu Leu
100 105 110Thr Leu Tyr Asp Lys Asp Ile Leu Gly Ser Asp Gln Leu Ser Leu Leu
115 120 125Leu Phe Asp Leu Arg Ser Leu Lys Cys Gly Gln Pro His Lys His Thr
130 135 140Phe Pro Leu Asn His Gln Asp Ser Gln Glu Leu Gln Val Glu Phe Val
145 150 155 160Leu Glu Lys Ser Gln Val Pro Ala Ser Glu Val Ile Thr Asn Gly Val
165 170 175Leu Val Ala His Pro Cys Leu Arg Ile Gln Gly Thr Leu Arg Gly Asp
180 185 190Gly Thr Ala Pro Arg Glu Glu Tyr Gly Ser Gly Gln Leu Gln Leu Ala
195 200 205Val Pro Gly Ala Tyr Glu Lys Pro Gln Leu Leu Pro Leu Gln Pro Pro
210 215 220Thr Glu Pro Gly Leu Pro Pro Thr Phe Thr Phe His Val Asn Pro Val
225 230 235 240Leu Ser Ser Arg Leu His Val Glu Leu Met Glu Leu Leu Ala Ala Val
245 250 255Gln Ser Gly Pro Ser Thr Glu Leu Glu Ala Gln Thr Ser Lys Leu Gly
260 265 270

3/52

Glu Gly Gly Ile Leu Leu Ser Ser Leu Pro Leu Gly Gln Glu Glu Gln
275 280 285

Cys Ser Val Ala Leu Gly Glu Gly Gln Glu Val Ala Leu Ser Met Lys
290 295 300

Val Glu Met Ser Ser Gly Asp Leu Asp Leu Arg Leu Gly Phe Asp Leu
305 310 315 320

Ser Asp Gly Glu Gln Glu Phe Leu Asp Arg Arg Lys Gln Val Val Ser
325 330 335

Lys Ala Leu Gln Gln Val Leu Gly Leu Ser Glu Ala Leu Asp Ser Gly
340 345 350

Gln Val Pro Val Val Ala Val Leu Gly Ser Gly Gly Thr Arg Ala
355 360 365

Met Ser Ser Leu Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Leu Gln Glu Leu Gly Leu
370 375 380

Leu Asp Thr Val Thr Tyr Leu Ser Gly Val Ser Gly Ser Thr Trp Cys
385 390 395 400

Ile Ser Thr Leu Tyr Arg Asp Pro Ala Trp Ser Gln Val Ala Leu Gln
405 410 415

Gly Pro Ile Glu Arg Ala Gln Val His Val Cys Ser Ser Lys Met Gly
420 425 430

Ala Leu Ser Thr Glu Arg Leu Gln Tyr Tyr Gln Glu Leu Gly Val
435 440 445

Arg Glu Arg Ser Gly His Ser Val Ser Leu Ile Asp Leu Trp Gly Leu
450 455 460

Leu Val Glu Tyr Leu Leu Tyr Gln Glu Glu Asn Pro Ala Lys Leu Ser
465 470 475 480

4/52

Asp Gln Gln Glu Ala Val Arg Gln Gly Gln Asn Pro Tyr Pro Ile Tyr
485 490 495

Thr Ser Val Asn Val Arg Thr Asn Leu Ser Gly Glu Asp Phe Ala Glu
500 505 510

Trp Cys Glu Phe Thr Pro Tyr Glu Val Gly Phe Pro Lys Tyr Gly Ala
515 520 525

Tyr Val Pro Thr Glu Leu Phe Gly Ser Glu Leu Phe Met Gly Arg Leu
530 535 540

Leu Gln Leu Gln Pro Glu Pro Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Gly Met Trp
545 550 555 560

Gly Ser Ala Phe Ala Thr Ser Leu Asp Glu Ile Phe Leu Lys Thr Ala
565 570 575

Gly Ser Gly Leu Ser Phe Leu Glu Trp Tyr Arg Gly Ser Val Asn Ile
580 585 590

Thr Asp Asp Cys Gln Lys Pro Gln Leu His Asn Pro Ser Arg Leu Arg
595 600 605

Thr Arg Leu Leu Thr Pro Gln Gly Pro Phe Ser Gln Ala Val Leu Asp
610 615 620

Ile Phe Thr Ser Arg Phe Thr Ser Ala Gln Ser Phe Asn Phe Thr Arg
625 630 635 640

Gly Leu Cys Leu His Lys Asp Tyr Val Ala Gly Arg Glu Phe Val Ala
645 650 655

Trp Lys Asp Thr His Pro Asp Ala Phe Pro Asn Gln Leu Thr Pro Met
660 665 670

Arg Asp Cys Leu Tyr Leu Val Asp Gly Gly Phe Ala Ile Asn Ser Pro

5/52

675	680	685
Phe Pro Leu Ala Leu Leu Pro Gln Arg Ala Val Asp Leu Ile Leu Ser		
690	695	700
Phe Asp Tyr Ser Leu Glu Ala Pro Phe Glu Val Leu Lys Met Thr Glu		
705	710	715
720		
Lys Tyr Cys Leu Asp Arg Gly Ile Pro Phe Pro Ser Ile Glu Val Gly		
725	730	735
Pro Glu Asp Val Glu Glu Ala Arg Glu Cys Tyr Leu Phe Ala Lys Ala		
740	745	750
Glu Asp Pro Arg Ser Pro Ile Val Leu His Phe Pro Leu Val Asn Arg		
755	760	765
Thr Phe Arg Thr His Leu Ala Pro Gly Val Glu Arg Gln Thr Ala Glu		
770	775	780
Glu Lys Ala Phe Gly Asp Phe Val Ile Asn Arg Pro Asp Thr Pro Tyr		
785	790	795
800		
Gly Met Met Asn Phe Thr Tyr Glu Pro Gln Asp Phe Tyr Arg Leu Val		
805	810	815
Ala Leu Ser Arg Tyr Asn Val Leu Asn Asn Val Glu Thr Leu Lys Cys		
820	825	830
Ala Leu Gln Leu Ala Leu Asp Arg His Gln Ala Arg Glu Arg Ala Gly		
835	840	845
Ala		
<210> 2		
<211> 3460		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		

6/52

<220>

<221> CDS

<222> (93)..(2639)

<400> 2

aactcagtgc tgcctgtcac acctgagcca gcagtttgt caaccagagg agcgcaggca 60

gggttccctg ctggggcccg ggctgccag cc atg ctt tgg gca ctc tgg cca 113
Met Leu Trp Ala Leu Trp Pro
1 5agg tgg ctg gca gac aag atg ctg ccc ctc ctg ggg gca gtg ctg ctt 161
Arg Trp Leu Ala Asp Lys Met Leu Pro Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu
10 15 20cag aag aga gag aag agg ggc cct ctg tgg agg cac tgg cgg cgg gaa 209
Gln Lys Arg Glu Lys Arg Gly Pro Leu Trp Arg His Trp Arg Arg Glu
25 30 35acc tac cca tac tat gac ctc cag gtg aag gtg ctg agg gcc aca aac 257
Thr Tyr Pro Tyr Tyr Asp Leu Gln Val Lys Val Leu Arg Ala Thr Asn
40 45 50 55atc cgg ggc aca gac ctg ctg tcc aaa gcc gac tgc tat gtgcaa ctg 305
Ile Arg Gly Thr Asp Leu Leu Ser Lys Ala Asp Cys Tyr Val Gln Leu
60 65 70tgg ctg ccc acg gcg tcc cca agc cct gcc cag act agg ata gtg gcc 353
Trp Leu Pro Thr Ala Ser Pro Ser Pro Ala Gln Thr Arg Ile Val Ala
75 80 85aac tgc agt gac ccc gag tgg aat gag acc ttc cac tac cag atc cat 401
Asn Cys Ser Asp Pro Glu Trp Asn Glu Thr Phe His Tyr Gln Ile His
90 95 100ggt gct gtg aag aac gtc ctg gag ctc acc ctc tat gac aag gac atc 449
Gly Ala Val Lys Asn Val Leu Glu Leu Thr Leu Tyr Asp Lys Asp Ile

7/52

105	110	115	.	
ctg ggc agc gac cag ctc tct ctg ctc ctg ttt gac ctg aga agc ctc Leu Gly Ser Asp Gln Leu Ser Leu Leu Phe Asp Leu Arg Ser Leu				497
120	125	130		135
aag tgt ggc caa cct cac aaa cac acc ttc cca ctc aac cac cag gat Lys Cys Gly Gln Pro His Lys His Thr Phe Pro Leu Asn His Gln Asp				545
140	145	150		
tca caa gag ctg cag gtg gaa ttt gtt ctg gag aag agc cag gtg cct Ser Gln Glu Leu Gln Val Glu Phe Val Leu Glu Lys Ser Gln Val Pro				593
155	160	165		
gca tct gaa gtc atc acc aac ggg gtt ctg gtg gct cac ccc tgt ctg Ala Ser Glu Val Ile Thr Asn Gly Val Leu Val Ala His Pro Cys Leu				641
170	175	180		
aga atc cag ggc acg ctc cgg gga gat ggg aca gcc cca cgg gaa gag Arg Ile Gln Gly Thr Leu Arg Gly Asp Gly Thr Ala Pro Arg Glu Glu				689
185	190	195		
tac ggc tct ggg cag ctc cag ctg gca gtg cct gga gcc tac gag aag Tyr Gly Ser Gly Gln Leu Gln Leu Ala Val Pro Gly Ala Tyr Glu Lys				737
200	205	210		215
cca cag ctc ttg ccc ctg cag cct ccc aca gag cca ggc ctc cca ccc Pro Gln Leu Leu Pro Leu Gln Pro Pro Thr Glu Pro Gly Leu Pro Pro				785
220	225	230		
acc ttt acc ttc cac gtg aac cca gtg ctg agc tcc agg cta cac gtg Thr Phe Thr Phe His Val Asn Pro Val Leu Ser Ser Arg Leu His Val				833
235	240	245		
gag ctg atg gag ctg ctg gca gct gtg cag agt ggc ccc agc aca gag Glu Leu Met Glu Leu Leu Ala Ala Val Gln Ser Gly Pro Ser Thr Glu				881
250	255	260		

8/52

ttg gag gct cag acc agc aag ctg ggc gag ggg ggc atc ctg ctc tcc 929
 Leu Glu Ala Gln Thr Ser Lys Leu Gly Glu Gly Gly Ile Leu Leu Ser
 265 270 275

tct ctg ccc cta ggc cag gag gaa cag tgt tct gtg gcc ctg ggg gag 977
 Ser Leu Pro Leu Gly Gln Glu Glu Gln Cys Ser Val Ala Leu Gly Glu
 280 285 290 295

ggc cag gag gtg gct ctg agc atg aag gtg gaa atg agc tcc ggg gac 1025
 Gly Gln Glu Val Ala Leu Ser Met Lys Val Glu Met Ser Ser Gly Asp
 300 305 310

cta gac cta cgc ctt ggc ttt gac ctc tct gac ggg gag cag gag ttt 1073
 Leu Asp Leu Arg Leu Gly Phe Asp Leu Ser Asp Gly Glu Gln Glu Phe
 315 320 325

ctg gac agg agg aag cag gtc gtg tcc aag gcc ctg cag caa gtg ctg 1121
 Leu Asp Arg Arg Lys Gln Val Val Ser Lys Ala Leu Gln Gln Val Leu
 330 335 340

gga ttg agt gag gct ctg gac agt ggc cag gtg cct gta gtg gct gtg 1169
 Gly Leu Ser Glu Ala Leu Asp Ser Gly Gln Val Pro Val Val Ala Val
 345 350 355

ttg ggt tcc ggg ggt gga acc cga gcc atg tct tct ctg tac ggc agc 1217
 Leu Gly Ser Gly Gly Thr Arg Ala Met Ser Ser Leu Tyr Gly Ser
 360 365 370 375

ctg gca ggg ttg cag gag ctc ggc ctt cta gac act gtg acc tac ctg 1265
 Leu Ala Gly Leu Gln Glu Leu Gly Leu Leu Asp Thr Val Thr Tyr Leu
 380 385 390

agt ggg gtc tct ggg tct acc tgg tgc atc tcc aca ctc tac agg gac 1313
 Ser Gly Val Ser Gly Ser Thr Trp Cys Ile Ser Thr Leu Tyr Arg Asp
 395 400 405

cca gcc tgg tcc cag gtg gcc ttg cag ggc ccc att gag cgt gcc cag 1361
 Pro Ala Trp Ser Gln Val Ala Leu Gln Gly Pro Ile Glu Arg Ala Gln

9/52

410	415	420	
gtt cac gtc tgc agc agt aag atg gga gct ttg tcc acg gag cgg cta Val His Val Cys Ser Ser Lys Met Gly Ala Leu Ser Thr Glu Arg Leu			1409
425	430	435	
cag tac tac act cag gaa ctg ggg gtc cgg gag cgc agt ggc cac agc Gln Tyr Tyr Thr Gln Glu Leu Gly Val Arg Glu Arg Ser Gly His Ser			1457
440	445	450	455
gtg tcc ctc atc gac ctc tgg ggc ctc ctt gtt gag tat ctc ctg tac Val Ser Leu Ile Asp Leu Trp Gly Leu Leu Val Glu Tyr Leu Leu Tyr			1505
460	465	470	
cag gag gag aac cct gcc aag ctg tct gac caa cag gag gcg gtc cgc Gln Glu Glu Asn Pro Ala Lys Leu Ser Asp Gln Gln Glu Ala Val Arg			1553
475	480	485	
cag ggt cag aac cct tac ccc att tac acc agt gtc aac gtc cgc acc Gln Gly Gln Asn Pro Tyr Pro Ile Tyr Thr Ser Val Asn Val Arg Thr			1601
490	495	500	
aac ttg agt ggg gaa gat ttt gca gag tgg tgc gag ttc acg ccc tat Asn Leu Ser Gly Glu Asp Phe Ala Glu Trp Cys Glu Phe Thr Pro Tyr			1649
505	510	515	
gag gtt ggc ttc ccc aag tac ggg gct tat gtt ccc acc gag ctc ttc Glu Val Gly Phe Pro Lys Tyr Gly Ala Tyr Val Pro Thr Glu Leu Phe			1697
520	525	530	535
ggc tca gaa ctc ttc atg gga cga ttg ctg cag ctc cag cct gaa ccc Gly Ser Glu Leu Phe Met Gly Arg Leu Leu Gln Leu Gln Pro Glu Pro			1745
540	545	550	
cgg atc tgt tac ctg caa ggt atg tgg ggc agc gcc ttt gcc acc agc Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Gly Met Trp Gly Ser Ala Phe Ala Thr Ser			1793
555	560	565	

10/52

ctg gat gag atc ttc cta aag acc gcc ggc tcg ggc ctc agc ttc ctg 1841
 Leu Asp Glu Ile Phe Leu Lys Thr Ala Gly Ser Gly Leu Ser Phe Leu
 570 575 580

gag tgg tac aga ggc agt gtg aat atc aca gac gac tgc cag aag cct 1889
 Glu Trp Tyr Arg Gly Ser Val Asn Ile Thr Asp Asp Cys Gln Lys Pro
 585 590 595

cag ctg cac aac ccc tcg agg ctg cga acg agg ctc ctc acc cca cag 1937
 Gln Leu His Asn Pro Ser Arg Leu Arg Thr Arg Leu Leu Thr Pro Gln
 600 605 610 615

ggg ccc ttc tcc cag gct gtg ctg gac ata ttc acc tcc cgc ttc act 1985
 Gly Pro Phe Ser Gln Ala Val Leu Asp Ile Phe Thr Ser Arg Phe Thr
 620 625 630

tcc gcc cag agc ttt aac ttc acc cgg ggt ctc tgc ttg cac aag gac 2033
 Ser Ala Gln Ser Phe Asn Phe Thr Arg Gly Leu Cys Leu His Lys Asp
 635 640 645

tat gtg gct ggc agg gag ttc gtg gcc tgg aaa gac aca cac ccg gac 2081
 Tyr Val Ala Gly Arg Glu Phe Val Ala Trp Lys Asp Thr His Pro Asp
 650 655 660

gcc ttc ccc aac cag ctc acc ccc atg cgg gac tgc ctg tac ctg gtg 2129
 Ala Phe Pro Asn Gln Leu Thr Pro Met Arg Asp Cys Leu Tyr Leu Val
 665 670 675

gac gga ggc ttt gcc atc aac tct ccg ttc cca ctg gct ctg ctg cct 2177
 Asp Gly Gly Phe Ala Ile Asn Ser Pro Phe Pro Leu Ala Leu Leu Pro
 680 685 690 695

cag aga gca gtg gac ctc att ctg tcc ttt gac tat tcc ttg gaa gcc 2225
 Gln Arg Ala Val Asp Leu Ile Leu Ser Phe Asp Tyr Ser Leu Glu Ala
 700 705 710

cct ttt gag gtc ttg aag atg aca gag aag tac tgc ctg gac cga gga 2273
 Pro Phe Glu Val Leu Lys Met Thr Glu Lys Tyr Cys Leu Asp Arg Gly

11/52

715 720 725

atc ccc ttc cct agc atc gag gtg ggc cct gag gac gtg gag gag gcc 2321
 Ile Pro Phe Pro Ser Ile Glu Val Gly Pro Glu Asp Val Glu Glu Ala
 730 735 740

cgt gag tgc tat ctg ttt gcc aag gct gag gac ccc cgc tcc ccc att 2369
 Arg Glu Cys Tyr Leu Phe Ala Lys Ala Glu Asp Pro Arg Ser Pro Ile
 745 750 755

gtg ctg cac ttc ccc ctg gtt aac cgt acc ttc cgc aca cac ctg gcc 2417
 Val Leu His Phe Pro Leu Val Asn Arg Thr Phe Arg Thr His Leu Ala
 760 765 770 775

cca ggt gtg gag cga caa aca gct gag aag gcc ttt ggg gac ttt 2465
 Pro Gly Val Glu Arg Gln Thr Ala Glu Glu Lys Ala Phe Gly Asp Phe
 780 785 790

gtc atc aac agg cca gac acc ccc tat ggc atg atg aac ttc acc tat 2513
 Val Ile Asn Arg Pro Asp Thr Pro Tyr Gly Met Met Asn Phe Thr Tyr
 795 800 805

gag ccc cag gac ttt tat cgg ctg gtg gcc ctc agt cga tac aac gtc 2561
 Glu Pro Gln Asp Phe Tyr Arg Leu Val Ala Leu Ser Arg Tyr Asn Val
 810 815 820

ctg aac aat gtg gag acc ttg aag tgc gcc ctc cag ctg gct ctg gac 2609
 Leu Asn Asn Val Glu Thr Leu Lys Cys Ala Leu Gln Leu Ala Leu Asp
 825 830 835

cgg cac cag gct cgg gag agg gca ggg gcc tgaccaaggc aggaagcgga 2659
 Arg His Gln Ala Arg Glu Arg Ala Gly Ala
 840 845

ggactgtgac agagaggaga cacactgctc atggtcaggg cttgttagagg gaggagcgat 2719

ggggactctg tgcaggatct gttcccttc tctccaggac ctgcctcgag gtgccccagg 2779

12/52

ccccggaaag ctcttcaga attgcagctt ggactgggc agggctctcc ttgtgttt 2839
ttggagaaga tggcagtag atcgctccag ggactttgg ggatgttaggg cagaagagaa 2899
cagcactcat ttcacagcgg ggtgtggaga gaatcaggta aaccacagag cccacccag 2959
acacagaagg acctcagagg gcccaagtcc tcagacccac acagaacagg ggctgagggc 3019
actgagaagc cagctgtctt ctttacactg agatggaaag cagagatgca tccatccaca 3079
tttcctgcag agcggccaag ccccaacccc acctcgagct cctggatgca ctgctatcaa 3139
gaacaatgag gggctgaggg gatggccagc ctatgttgc gactccatca tcctaaccct 3199
ctttctgcct tctggtctcc tcgtgcctcc tccagatca cccttcttt cccagcgccc 3259
taaaggctgt ggggtgatgt cccattctgg ctgctccagg tggagatgt gcgcgtgtct 3319
ccctgccagt tacccaggct tcactttcg aacctggacc acagtctctg gtgatgtgt 3379
tagtgccac atcatgaaa tatagtctca ccattcttag gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3439
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 3460

<210> 3
<211> 454
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Met Leu Trp Ala Leu Trp Pro Arg Trp Leu Ala Asp Lys Met Leu Pro
1 5 10 15
Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Gln Lys Arg Glu Lys Arg Gly Pro Leu
20 25 30
Trp Arg His Trp Arg Arg Glu Thr Tyr Pro Tyr Tyr Asp Leu Gln Val
35 40 45

13/52

Lys Val Leu Arg Ala Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asp Leu Leu Ser Lys
50 55 60

Ala Asp Cys Tyr Val Gln Leu Trp Leu Pro Thr Ala Ser Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ala Gln Thr Arg Ile Val Ala Asn Cys Ser Asp Pro Glu Trp Asn Glu
85 90 95

Thr Phe His Tyr Gln Ile His Gly Ala Val Lys Asn Val Leu Glu Leu
100 105 110

Thr Leu Tyr Asp Lys Asp Ile Leu Gly Ser Asp Gln Leu Ser Leu Leu
115 120 125

Leu Phe Asp Leu Arg Ser Leu Lys Cys Gly Gln Pro His Lys His Thr
130 135 140

Phe Pro Leu Asn His Gln Asp Ser Gln Glu Leu Gln Val Glu Phe Val
145 150 155 160

Leu Glu Lys Ser Gln Val Pro Ala Ser Glu Val Ile Thr Asn Gly Val
165 170 175

Leu Val Ala His Pro Cys Leu Arg Ile Gln Gly Thr Leu Arg Gly Asp
180 185 190

Gly Thr Ala Pro Arg Glu Glu Tyr Gly Ser Gly Gln Leu Gln Leu Ala
195 200 205

Val Pro Gly Ala Tyr Glu Lys Pro Gln Leu Leu Pro Leu Gln Pro Pro
210 215 220

Thr Glu Pro Gly Leu Pro Pro Thr Phe Thr Phe His Val Asn Pro Val
225 230 235 240

Leu Ser Ser Arg Leu His Val Glu Leu Met Glu Leu Leu Ala Ala Val

14/52

245 250 255

Gln Ser Gly Pro Ser Thr Glu Leu Glu Ala Gln Thr Ser Lys Leu Gly
260 265 270Glu Gly Gly Ile Leu Leu Ser Ser Leu Pro Leu Gly Gln Glu Glu Gln
275 280 285Cys Ser Val Ala Leu Gly Glu Gly Gln Glu Val Ala Leu Ser Met Lys
290 295 300Val Glu Met Ser Ser Gly Asp Leu Asp Leu Arg Leu Gly Phe Asp Leu
305 310 315 320Ser Asp Gly Glu Gln Glu Phe Leu Asp Arg Arg Lys Gln Val Val Ser
325 330 335Lys Ala Leu Gln Gln Val Leu Gly Leu Ser Glu Ala Leu Asp Ser Gly
340 345 350Gln Val Pro Val Val Ala Val Leu Gly Ser Gly Gly Thr Arg Ala
355 360 365Met Ser Ser Leu Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Leu Gln Glu Leu Gly Leu
370 375 380Leu Asp Thr Val Thr Tyr Leu Ser Gly Val Ser Gly Ser Thr Trp Cys
385 390 395 400Ile Ser Thr Leu Tyr Arg Asp Pro Ala Trp Ser Gln Val Ala Leu Gln
405 410 415Gly Pro Ile Glu Arg Ala Gln Val His Val Cys Ser Ser Lys Met Gly
420 425 430Asp Val Arg Val Ser Pro Cys Gln Leu Pro Arg Leu His Ser Ser Asn
435 440 445

15/52

Leu Asp His Ser Leu Trp

450

<210> 4

<211> 1519

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (93)..(1454)

<400> 4

aactcagtgc tgcctgtcac acctgagcca gcagtttgc caaccagagg agcgcaggca 60

gggttccctg ctggggcccg ggctgccag cc atg ctt tgg gca ctc tgg cca 113

Met Leu Trp Ala Leu Trp Pro

1 5

agg tgg ctg gca gac aag atg ctg ccc ctc ctg ggg gca gtg ctg ctt 161

Arg Trp Leu Ala Asp Lys Met Leu Pro Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu

10 15 20

cag aag aga gag aag agg ggc cct ctg tgg agg cac tgg cgg cgg gaa 209

Gln Lys Arg Glu Lys Arg Gly Pro Leu Trp Arg His Trp Arg Arg Glu

25 30 35

acc tac cca tac tat gac ctc cag gtg aag gtg ctg agg gcc aca aac 257

Thr Tyr Pro Tyr Tyr Asp Leu Gln Val Lys Val Leu Arg Ala Thr Asn

40 45 50 55

atc cgg ggc aca gac ctg ctg tcc aaa gcc gac tgc tat gtg caa ctg 305

Ile Arg Gly Thr Asp Leu Leu Ser Lys Ala Asp Cys Tyr Val Gln Leu

60 65 70

tgg ctg ccc acg gcg tcc cca agc cct gcc cag act agg ata gtg gcc 353

Trp Leu Pro Thr Ala Ser Pro Ser Pro Ala Gln Thr Arg Ile Val Ala

75 80 85

16/52

aac tgc agt gac ccc gag tgg aat gag acc ttc cac tac cag atc cat 401
 Asn Cys Ser Asp Pro Glu Trp Asn Glu Thr Phe His Tyr Gln Ile His

90

95

100

ggt gct gtg aag aac gtc ctg gag ctc acc ctc tat gac aag gac atc 449
 Gly Ala Val Lys Asn Val Leu Glu Leu Thr Leu Tyr Asp Lys Asp Ile
 105 110 115

ctg ggc agc gac cag ctc tct ctg ctc ctg ttt gac ctg aga agc ctc 497
 Leu Gly Ser Asp Gln Leu Ser Leu Leu Leu Phe Asp Leu Arg Ser Leu
 120 125 130 135

aag tgt ggc caa cct cac aaa cac acc ttc cca ctc aac cac cag gat 545
 Lys Cys Gly Gln Pro His Lys His Thr Phe Pro Leu Asn His Gln Asp
 140 145 150

tca caa gag ctg cag gtg gaa ttt gtt ctg gag aag agc cag gtg cct 593
 Ser Gln Glu Leu Gln Val Glu Phe Val Leu Glu Lys Ser Gln Val Pro
 155 160 165

gca tct gaa gtc atc acc aac ggg gtt ctg gtg gct cac ccc tgt ctg 641
 Ala Ser Glu Val Ile Thr Asn Gly Val Leu Val Ala His Pro Cys Leu
 170 175 180

aga atc cag ggc acg ctc cgg gga gat ggg aca gcc cca cgg gaa gag 689
 Arg Ile Gln Gly Thr Leu Arg Gly Asp Gly Thr Ala Pro Arg Glu Glu
 185 190 195

tac ggc tct ggg cag ctc cag ctg gca gtg cct gga gcc tac gag aag 737
 Tyr Gly Ser Gly Gln Leu Gln Leu Ala Val Pro Gly Ala Tyr Glu Lys
 200 205 210 215

cca cag ctc ttg ccc ctg cag cct ccc aca gag cca ggc ctc cca ccc 785
 Pro Gln Leu Leu Pro Leu Gln Pro Pro Thr Glu Pro Gly Leu Pro Pro
 220 225 230

acc ttt acc ttc cac gtg aac cca gtg ctg agc tcc agg cta cac gtg 833

17/52

Thr Phe Thr Phe His Val Asn Pro Val Leu Ser Ser Arg Leu His Val
 235 240 245

gag ctg atg gag ctg ctg gca gct gtg cag agt ggc ccc agc aca gag 881
 Glu Leu Met Glu Leu Leu Ala Ala Val Gln Ser Gly Pro Ser Thr Glu
 250 255 260

ttg gag gct cag acc agc aag ctg ggc gag ggg ggc atc ctg ctc tcc 929
 Leu Glu Ala Gln Thr Ser Lys Leu Gly Glu Gly Gly Ile Leu Leu Ser
 265 270 275

tct ctg ccc cta ggc cag gag gaa cag tgt tct gtg gcc ctg ggg gag 977
 Ser Leu Pro Leu Gly Gln Glu Glu Gln Cys Ser Val Ala Leu Gly Glu
 280 285 290 295

ggc cag gag gtg gct ctg agc atg aag gtg gaa atg agc tcc ggg gac 1025
 Gly Gln Glu Val Ala Leu Ser Met Lys Val Glu Met Ser Ser Gly Asp
 300 305 310

cta gac cta cgc ctt ggc ttt gac ctc tct gac ggg gag cag gag ttt 1073
 Leu Asp Leu Arg Leu Gly Phe Asp Leu Ser Asp Gly Glu Gln Glu Phe
 315 320 325

ctg gac agg agg aag cag gtc gtg tcc aag gcc ctg cag caa gtg ctg 1121
 Leu Asp Arg Arg Lys Gln Val Val Ser Lys Ala Leu Gln Gln Val Leu
 330 335 340

gga ttg agt gag gct ctg gac agt ggc cag gtg cct gta gtg gct gtg 1169
 Gly Leu Ser Glu Ala Leu Asp Ser Gly Gln Val Pro Val Val Ala Val
 345 350 355

ttg ggt tcc ggg ggt gga acc cga gcc atg tct tct ctg tac ggc agc 1217
 Leu Gly Ser Gly Gly Thr Arg Ala Met Ser Ser Leu Tyr Gly Ser
 360 365 370 375

ctg gca ggg ttg cag gag ctc ggc ctt cta gac act gtg acc tac ctg 1265
 Leu Ala Gly Leu Gln Glu Leu Gly Leu Leu Asp Thr Val Thr Tyr Leu
 380 385 390

18/52

agt ggg gtc tct ggg tct acc tgg tgc atc tcc aca ctc tac agg gac 1313
Ser Gly Val Ser Gly Ser Thr Trp Cys Ile Ser Thr Leu Tyr Arg Asp

395 400 405

cca gcc tgg tcc cag gtg gcc ttg cag ggc ccc att gag cgt gcc cag 1361
Pro Ala Trp Ser Gln Val Ala Leu Gln Gly Pro Ile Glu Arg Ala Gln
410 415 420

gtt cac gtc tgc agc agt aag atg gga gat gtg cgc gtg tct ccc tgc 1409
Val His Val Cys Ser Ser Lys Met Gly Asp Val Arg Val Ser Pro Cys
425 430 435

cag tta ccc agg ctt cac tct tcg aac ctg gac cac agt ctc tgg tgatgt1460
Gln Leu Pro Arg Leu His Ser Ser Asn Leu Asp His Ser Leu Trp
440 445 450

gtgttagtggc cacatcatgc aaatatagtc tcaccattcc tagaaaaaaa aaaaaaaaaa 1519

<210> 5

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA

<400> 5

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg 30

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

19/52

<400> 6

gcggctgaag acggcctatg tggcctttt tttttttt tt

42

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

agcatcgagt cggccttggtt g

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

tttctgctct aaaagctgcg

20

<210> 10

<211> 20

20/52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

tgtgggagg ttttctcta

20

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

gagccatgtc ttctctgtac ggca

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

ctagacactg tgacctacct gagt

24

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

21/52

<400> 13

ccgtgagtgc tatctgtttg

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

tctgtggctc acctgattct

20

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gly Xaa Ser Gly Ser

1

5

<210> 16

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

cgggatcccg ccaccatgga ctacaaggac gatgacgaca agatgctgcc cctcctg 57

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

22/52

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

tactgctgca gacgtgaacc t

21

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

tccgcttcct gccttggtca

20

<210> 19

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

gaaaacagct atgacc

16

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

23/52

<400> 20
ctcattccat tctggatcac tgct

24

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21
gttaaccact gtccttgtct gact

24

<210> 22
<211> 854
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 22
Met Pro Trp Thr Leu Gln Pro Lys Trp Leu Ala Gly Lys Gly Leu Pro
1 5 10 15

Leu Leu Gly Ala Ile Leu Leu Arg Lys Thr Glu Lys Ser Glu Pro Gln
20 25 30

Trp Lys His Arg Arg Glu Thr His Pro Tyr Tyr Asp Leu Gln Val Lys
35 40 45

Val Leu Arg Ala Arg Asn Ile Gln His Thr Asp Lys Leu Ser Lys Ala
50 55 60

Asp Cys Tyr Val Arg Leu Trp Leu Pro Thr Ala Ser Val Ser Pro Ser
65 70 75 80

Gln Thr Arg Thr Val Val Asn Ser Ser Asp Pro Glu Trp Asn Glu Thr
85 90 95

24/52

Phe His Tyr Gln Ile His Gly Ala Val Lys Asn Val Leu Glu Leu Ala
100 105 110

Leu Tyr Asp Glu Asp Val Leu Asp Ser Asp Asn Val Phe Ser Ile Leu
115 120 125

Phe Asp Met Ser Thr Leu Gln Leu Gly Gln Pro Cys Thr Lys Asn Phe
130 135 140

Thr Arg Gln Gln Asp Pro Lys Glu Leu Glu Val Glu Phe Thr Leu Glu
145 150 155 160

Lys Ser Gln Thr Pro Ala Ser Glu Val Val Thr Asn Gly Val Leu Val
165 170 175

Ala His Pro Cys Leu Arg Ile Gln Gly Thr Val Thr Gly Asp Lys Thr
180 185 190

Ala Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Arg Gln Ile Gln Leu Ala Val Pro
195 200 205

Gly Ala Tyr Glu Lys Pro Gln Pro Leu Gln Pro Thr Ser Glu Pro Gly
210 215 220

Leu Pro Val Asn Phe Thr Phe His Met Asn Pro Val Leu Ser Pro Lys
225 230 235 240

Leu His Ile Lys Leu Gln Glu Gln Leu Gln Val Phe His Ser Gly Pro
245 250 255

Ser Asp Glu Leu Glu Ala Gln Thr Ser Lys Met Asp Lys Ala Ser Ile
260 265 270

Leu Leu Ser Ser Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Thr Lys Leu Val Asp
275 280 285

Leu Glu Glu Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Met Lys Ala Asp Met Ser
290 295 300

25/52

Ser Ser Gly Asp Leu Asp Leu Arg Leu Gly Phe Asp Leu Cys Asp Gly
305 310 315 320

Glu Gln Glu Phe Leu Asp Lys Arg Lys Gln Val Ala Ser Lys Ala Leu
325 330 335

Gln Arg Val Met Gly Leu Ser Glu Ala Leu His Cys Asp Gln Val Pro
340 345 350

Val Val Ala Val Leu Gly Ser Gly Gly Thr Arg Ala Met Thr Ser
355 360 365

Leu Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Leu Gln Glu Leu Gly Leu Leu Asp Ala
370 375 380

Val Thr Tyr Leu Ser Gly Val Ser Gly Ser Ser Trp Cys Ile Ser Thr
385 390 395 400

Leu Tyr Arg Asp Pro Ser Trp Ser Gln Lys Ala Leu Gln Gly Pro Ile
405 410 415

Lys Tyr Ala Ser Glu Arg Val Cys Ser Ser Lys Ile Gly Met Leu Ser
420 425 430

Pro Lys Gln Phe Glu Tyr Tyr Ser Arg Glu Lys Arg Ala Trp Glu Ser
435 440 445

Arg Gly His Ser Met Ser Phe Thr Asp Leu Trp Gly Leu Ile Ile Glu
450 455 460

Tyr Phe Leu Asn Gln Glu Glu Asn Pro Ala Lys Leu Ser Asp Gln Gln
465 470 475 480

Glu Thr Val Ser Gln Gly Gln Asn Pro Tyr Pro Ile Tyr Ala Ser Ile
485 490 495

Asn Val His Lys Asn Ile Ser Gly Asp Tyr Phe Ala Glu Trp Cys Glu

26/52

500 505 510

Phe Thr Pro Tyr Glu Val Gly Phe Pro Lys Tyr Gly Val Tyr Val Pro
515 520 525

Thr Glu Leu Phe Gly Ser Glu Phe Phe Met Gly Arg Leu Leu His Phe
530 535 540

Trp Pro Glu Pro Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Gly Met Trp Gly Ser Ala
545 550 555 560

Phe Ala Ala Ser Leu Tyr Glu Ile Phe Leu Lys Leu Gly Gly Leu Ser
565 570 575

Leu Ser Phe Leu Asp Trp His Arg Gly Ser Val Ser Val Thr Asp Asp
580 585 590

Trp Pro Lys Leu Arg Lys Gln Asp Pro Thr Arg Leu Pro Thr Arg Leu
595 600 605

Phe Thr Pro Met Ser Ser Phe Ser Gln Ala Val Leu Asp Ile Phe Thr
610 615 620

Ser Arg Ile Thr Cys Ala Gln Thr Phe Asn Phe Thr Arg Gly Leu Cys
625 630 635 640

Met Tyr Lys Asp Tyr Thr Ala Arg Lys Asp Phe Val Val Ser Glu Asp
645 650 655

Ala Trp His Ser His Asn Tyr Gly Tyr Pro Asp Ala Cys Pro Asn Gln
660 665 670

Leu Thr Pro Met Lys Asp Phe Leu Ser Leu Val Asp Gly Gly Phe Ala
675 680 685

Ile Asn Ser Pro Phe Pro Leu Val Leu Gln Pro Gln Arg Ala Val Asp
690 695 700

27/52

Leu Ile Val Ser Phe Asp Tyr Ser Leu Glu Gly Pro Phe Glu Val Leu
705 710 715 720

Gln Val Thr Glu Lys Tyr Cys Arg Asp Arg Gly Ile Pro Phe Pro Arg
725 730 735

Ile Glu Val Asp Pro Lys Asp Ser Glu Asp Pro Arg Glu Cys Tyr Leu
740 745 750

Phe Thr Glu Ala Glu Asp Pro Cys Ser Pro Ile Val Leu His Phe Pro
755 760 765

Leu Val Asn Arg Thr Phe Arg Thr His Leu Ala Pro Gly Val Glu Arg
770 775 780

Gln Thr Ala Glu Glu Lys Ala Phe Gly Asp Phe Ile Ile Asn Gly Pro
785 790 795 800

Asp Thr Ala Tyr Gly Met Met Asp Phe Thr Tyr Glu Pro Lys Glu Phe
805 810 815

Asp Arg Leu Val Thr Leu Ser Arg Tyr Asn Val Leu Asn Asn Lys Glu
820 825 830

Thr Ile Arg His Ala Leu Gln Leu Ala Leu Asp Arg Arg Arg Gln Ala
835 840 845

Gly Gly Arg Val Gly Gly
850

<210> 23

<211> 3112

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (69)..(2630)

<400> 23

gccagagaaa gggtggctct gggaaacagg caagctccct actgggacct gagctgctac 60

tgctggcc atg ccc tgg act ctc cag cca aag tgg ctg gca ggc aag gga 110
 Met Pro Thr Leu Gln Pro Lys Trp Leu Ala Gly Lys Gly
 1 5 10

ctt ccc ctt ctt gga gcc ata ctg cta cgg aag aca gaa aag agc gaa 158
 Leu Pro Leu Leu Gly Ala Ile Leu Leu Arg Lys Thr Glu Lys Ser Glu
 15 20 25 30

cca caa tgg aag cat agg cgg gaa acc cac cca tac tac gac ctt caa 206
 Pro Gln Trp Lys His Arg Arg Glu Thr His Pro Tyr Tyr Asp Leu Gln
 35 40 45

gtg aag gtg ctg agg gcc aga aac atc cag cac aca gat aag ttg tcc 254
 Val Lys Val Leu Arg Ala Arg Asn Ile Gln His Thr Asp Lys Leu Ser
 50 55 60

aaa gcc gac tgc tat gtt cga ctg tgg ctg ccc acg gct tct gtt agc 302
 Lys Ala Asp Cys Tyr Val Arg Leu Trp Leu Pro Thr Ala Ser Val Ser
 65 70 75

ccc agt cag aca agg aca gtg gtt aac agc agt gat cca gaa tgg aat 350
 Pro Ser Gln Thr Arg Thr Val Val Asn Ser Ser Asp Pro Glu Trp Asn
 80 85 90

gag acc ttt cac tat cag atc cac ggc gct gtg aag aac gtc ttg gag 398
 Glu Thr Phe His Tyr Gln Ile His Gly Ala Val Lys Asn Val Leu Glu
 95 100 105 110

ctt gcc ctt tat gac gag gat gtc ctg gac agt gac aat gtc ttc tcc 446
 Leu Ala Leu Tyr Asp Glu Asp Val Leu Asp Ser Asp Asn Val Phe Ser
 115 120 125

att ctg ttt gac atg agt act ctc cag cta ggc cag cct tgc aca aaa 494
 Ile Leu Phe Asp Met Ser Thr Leu Gln Leu Gly Gln Pro Cys Thr Lys

29/52

130 135 140

aac ttc acc agg cag cag gat cca aag gag ctg gaa gta gaa ttt act 542
 Asn Phe Thr Arg Gln Gln Asp Pro Lys Glu Leu Glu Val Glu Phe Thr
 145 150 155

ctg gaa aag agt cag acg cct gca tct gaa gtt gtc acc aat ggt gtc 590
 Leu Glu Lys Ser Gln Thr Pro Ala Ser Glu Val Val Thr Asn Gly Val
 160 165 170

ctg gtg gct cac ccc tgt ctg aga att cag ggc aca gtc act gga gac 638
 Leu Val Ala His Pro Cys Leu Arg Ile Gln Gly Thr Val Thr Gly Asp
 175 180 185 190

aag aca gcc tcc ctt gga gag ttg ggc tcc agg cag atc cag ctg gca 686
 Lys Thr Ala Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Arg Gln Ile Gln Leu Ala
 195 200 205

gtg cct ggg gcc tat gaa aag cca cag cct ctg cag ccg acc tcg gag 734
 Val Pro Gly Ala Tyr Glu Lys Pro Gln Pro Leu Gln Pro Thr Ser Glu
 210 215 220

cca ggc ctc cca gtg aac ttt acc ttc cac atg aac cca gtg ctg agc 782
 Pro Gly Leu Pro Val Asn Phe Thr Phe His Met Asn Pro Val Leu Ser
 225 230 235

ccc aag ctg cac ata aag ctg caa gaa cag ctc caa gtc ttc cat agt 830
 Pro Lys Leu His Ile Lys Leu Gln Glu Gln Leu Gln Val Phe His Ser
 240 245 250

ggc ccg agt gat gag ctg gaa gct cag acc agc aag atg gac aag gca 878
 Gly Pro Ser Asp Glu Leu Glu Ala Gln Thr Ser Lys Met Asp Lys Ala
 255 260 265 270

agc atc ctg ctc tcc tct ctg ccc ctc aac gag gag tta acg aaa ctt 926
 Ser Ile Leu Leu Ser Ser Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Thr Lys Leu
 275 280 285

30/52

gtg gac ctg gag gag ggc cag cag gtg act ctt agg atg aag gca gac 974
 Val Asp Leu Glu Glu Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Met Lys Ala Asp
 290 295 300

atg agc agc tct ggg gac ttg gac ctg cgc ctt ggt ttt gac ctc tgt 1022
 Met Ser Ser Ser Gly Asp Leu Asp Leu Arg Leu Gly Phe Asp Leu Cys
 305 310 315

gat ggg gag cag gaa ttt ctg gac aag agg aag cag gtg gcg tcc aag 1070
 Asp Gly Glu Gln Glu Phe Leu Asp Lys Arg Lys Gln Val Ala Ser Lys
 320 325 330

gcc ctg cag cgg gtg atg gga ttg agt gag gct ctg cac tgt gac cag 1118
 Ala Leu Gln Arg Val Met Gly Leu Ser Glu Ala Leu His Cys Asp Gln
 335 340 345 350

gta ccc gtg gta gcc gtg tta ggc tct ggg ggt gga acc aga gcc atg 1166
 Val Pro Val Val Ala Val Leu Gly Ser Gly Gly Thr Arg Ala Met
 355 360 365

act tcc ctg tac ggc agc ctg gct ggg ctg cag gag ctt ggt ctt ctg 1214
 Thr Ser Leu Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Leu Gln Glu Leu Gly Leu Leu
 370 375 380

gat gcc gtg acc tac ctg agt ggg gta tct ggg tct tcc tgg tgc atc 1262
 Asp Ala Val Thr Tyr Leu Ser Gly Val Ser Gly Ser Trp Cys Ile
 385 390 395

tct aca ctc tac agg gat cca tcc tgg tcc cag aag gct ttg cag ggc 1310
 Ser Thr Leu Tyr Arg Asp Pro Ser Trp Ser Gln Lys Ala Leu Gln Gly
 400 405 410

ccc att aaa tat gcc tca gag cga gtc tgc agc agt aaa att ggg atg 1358
 Pro Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Arg Val Cys Ser Ser Lys Ile Gly Met
 415 420 425 430

ctg tcc cca aag cag ttt gaa tac tac tcc cgg gaa aag aga gcc tgg 1406
 Leu Ser Pro Lys Gln Phe Glu Tyr Tyr Ser Arg Glu Lys Arg Ala Trp

31/52

435 440 445

gag agc agg gga cac agc atg tcc ttc act gac ttg tgg ggc ctc atc 1454
 Glu Ser Arg Gly His Ser Met Ser Phe Thr Asp Leu Trp Gly Leu Ile
 450 455 460

att gag tat ttc ctg aac cag gag gaa aac cct gcc aag ctg tca gac 1502
 Ile Glu Tyr Phe Leu Asn Gln Glu Glu Asn Pro Ala Lys Leu Ser Asp
 465 470 475

cag caa gaa acg gtc agc cag ggt cag aac cca tac ccc atc tat gcc 1550
 Gln Gln Glu Thr Val Ser Gln Gly Gln Asn Pro Tyr Pro Ile Tyr Ala
 480 485 490

agc att aat gtc cac aaa aac atc agt ggg gac tac ttt gca gag tgg 1598
 Ser Ile Asn Val His Lys Asn Ile Ser Gly Asp Tyr Phe Ala Glu Trp
 495 500 505 510

tgt gag ttc acc ccc tat gag gtc ggt ttc ccc aag tac ggg gtt tac 1646
 Cys Glu Phe Thr Pro Tyr Glu Val Gly Phe Pro Lys Tyr Gly Val Tyr
 515 520 525

gtt ccc acg gaa ctc ttt ggc tct gaa ttc ttc atg ggc egg ctg ctg 1694
 Val Pro Thr Glu Leu Phe Gly Ser Glu Phe Phe Met Gly Arg Leu Leu
 530 535 540

cat ttc tgg cca gag ccc cgc atc tgt tac ctg cag ggt atg tgg gga 1742
 His Phe Trp Pro Glu Pro Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Gly Met Trp Gly
 545 550 555

agt gct ttt gca gcc agc ctg tat gag atc ttc ctg aag ctg gga ggc 1790
 Ser Ala Phe Ala Ala Ser Leu Tyr Glu Ile Phe Leu Lys Leu Gly Gly
 560 565 570

cta agc ctg agc ttt ctg gac tgg cac agg ggg agt gtc agt gtc aca 1838
 Leu Ser Leu Ser Phe Leu Asp Trp His Arg Gly Ser Val Ser Val Thr
 575 580 585 590

32/52

gat gac tgg cca aag tta cgg aag cag gac ccc aca cgg ctg cct acc			1886
Asp Asp Trp Pro Lys Leu Arg Lys Gln Asp Pro Thr Arg Leu Pro Thr			
595	600	605	
agg ctc ttc acg cca atg agt tcc ttc tct cag gct gtg ctg gac ata			1934
Arg Leu Phe Thr Pro Met Ser Ser Phe Ser Gln Ala Val Leu Asp Ile			
610	615	620	
ttc acc tcc cgt att act tgt gcc cag acc ttt aac ttt acc cga ggt			1982
Phe Thr Ser Arg Ile Thr Cys Ala Gln Thr Phe Asn Phe Thr Arg Gly			
625	630	635	
ctc tgc atg tac aaa gac tac aca gct aga aag gac ttc gtg gtc tct			2030
Leu Cys Met Tyr Lys Asp Tyr Thr Ala Arg Lys Asp Phe Val Val Ser			
640	645	650	
gaa gat gca tgg cat tca cat aac tat gga tac cct gat gcc tgt ccc			2078
Glu Asp Ala Trp His Ser His Asn Tyr Gly Tyr Pro Asp Ala Cys Pro			
655	660	665	670
aac cag ctc aca ccc atg aag gac ttc ctg tcc cta gta gat gga ggc			2126
Asn Gln Leu Thr Pro Met Lys Asp Phe Leu Ser Leu Val Asp Gly Gly			
675	680	685	
ttt gct atc aac tcg cca ttt cca ctg gtc ctg cag ccg cag cgg gct			2174
Phe Ala Ile Asn Ser Pro Phe Pro Leu Val Leu Gln Pro Gln Arg Ala			
690	695	700	
gtg gac ctc att gtg tcc ttt gac tat tcc ttg gaa ggt cct ttt gag			2222
Val Asp Leu Ile Val Ser Phe Asp Tyr Ser Leu Glu Gly Pro Phe Glu			
705	710	715	
gtc ctg cag gtg aca gag aag tac tgc cgg gac cga ggg atc ccc ttc			2270
Val Leu Gln Val Thr Glu Lys Tyr Cys Arg Asp Arg Gly Ile Pro Phe			
720	725	730	
cca agg att gag gtg gac ccc aag gac tct gaa gac ccc cgt gaa tgc			2318
Pro Arg Ile Glu Val Asp Pro Lys Asp Ser Glu Asp Pro Arg Glu Cys			

33/52

735	740	745	750	
tat ctg ttt acc gag gca gag gac ccc tgc tcg ccc atc gtg ctg cat 2366 Tyr Leu Phe Thr Glu Ala Glu Asp Pro Cys Ser Pro Ile Val Leu His				
755		760		765
ttc cct ctg gtc aac agg acc ttt cgc acg cac ctg gcc cca ggt gtg 2414 Phe Pro Leu Val Asn Arg Thr Phe Arg Thr His Leu Ala Pro Gly Val				
770		775		780
gaa cga caa aca gct gag gag aag gcc ttc ggg gac ttt atc atc aac 2462 Glu Arg Gln Thr Ala Glu Glu Lys Ala Phe Gly Asp Phe Ile Ile Asn				
785		790		795
ggg cca gat act gcc tat ggc atg atg gat ttc acc tat gag ccc aag 2510 Gly Pro Asp Thr Ala Tyr Gly Met Met Asp Phe Thr Tyr Glu Pro Lys				
800		805		810
gaa ttt gat cgg ctg gtg acc ctg agc cga tac aac gtc ttg aac aac 2558 Glu Phe Asp Arg Leu Val Thr Leu Ser Arg Tyr Asn Val Leu Asn Asn				
815		820		825
830				
aag gag act atc agg cat gcc ctc cag ctg gct ctg gac cgg cgg cgg 2606 Lys Glu Thr Ile Arg His Ala Leu Gln Leu Ala Leu Asp Arg Arg Arg				
835		840		845
cag gct ggg gga agg gtt ggg ggc tgatcacatg agagtcagag gactgtggtg 2660 Gln Ala Gly Gly Arg Val Gly Gly				
850				
gtgtgatgga ggaccttaag tcagagtatg ctgaggaga gggaaagactt taaacacttt 2720				
ctgtttcca cttctccttc ccagagaaga tggggcagta tctctctctc tctctctcg 2780				
agtgcattggg ggtcctgtgc aggagagaac agagttcata ttatattggg gtgttagagag 2840				
ccaggcagca gttcatcag aaggcgcacc cccacccca ccacagaagg acctctggaa 2900				

34/52

agaacctcaag cattcagagc ttcaccacag agctgtggc tgaggaacca gctgtccta 2960

cactgatgca gaactacagc tgctcacact tccacagagt gcccagctc gacccactcc 3020

aagccccgg actcagtgat gtggagaata aacagcagct atgtgggtcg ccagcctgtg 3080

tcactgaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aa 3112

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24

tgytayytnc arggnatgtg g 21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25

ytcrctangtr aarttcatca t 21

<210> 26

<211> 261

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 26

Tyr Leu Gln Gly Met Trp Gly Ser Ala Phe Ala Ala Ser Leu Tyr Glu

35/52

1

5

10

15

Ile Phe Leu Lys Met Arg Gly Pro Arg Leu Gly Phe Leu Asp Trp His
20 25 30

Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Asp Asp Trp Pro Lys Leu Arg Lys Gln
35 40 45

Asp Pro Thr Arg Leu Pro Thr Arg Leu Phe Thr Ser Lys Ser Phe Phe
50 55 60

Ser Lys Ala Val Leu Asp Ile Phe Thr Ser Arg Phe Thr Cys Ala Gln
65 70 75 80

Thr Phe Asn Phe Thr Arg Gly Leu Cys Leu Tyr Lys Asp Tyr Thr Ala
85 90 95

Arg Lys Asp Phe Val Val Ser Glu Asp Ala Trp His Ser Asp Asn Tyr
100 105 110

Lys His Leu Asp Ala Cys Pro Asn Gln Leu Thr Pro Met Lys Asp Phe
115 120 125

Leu Ser Leu Val Asp Gly Gly Phe Ala Ile Asn Ser Pro Phe Pro Leu
130 135 140

Ile Leu Gln Pro Gln Arg Ala Val Asp Leu Ile Val Ser Phe Asp Tyr
145 150 155 160

Ser Leu Glu Ala Pro Phe Glu Val Leu Gln Val Thr Glu Lys Tyr Cys
165 170 175

Arg Asp Arg Gly Ile Pro Phe Pro Arg Ile Glu Val Asp Pro Lys Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Pro Arg Glu Cys Tyr Leu Phe Thr Glu Ala Glu Asp Pro
195 200 205

36/52

Cys Ser Pro Ile Val Leu His Phe Pro Leu Val Asn Arg Thr Phe Arg
210 215 220

Lys His Leu Ala Pro Gly Val Glu Arg Gln Thr Ala Glu Glu Lys Ala
225 230 235 240

Phe Gly Asp Phe Ile Ile Asn Gly Pro Asp Thr Ala Tyr Gly Met Met
245 250 255

Asn Phe Thr Tyr Glu
260

<210> 27

<211> 783

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 27

tacttgcagg gaatgtgggg aagtgccttt gcagccagcc tgtatgagat cttcctgaag 60

atgagaggcc caagactggg cttcctggac tggcacagag gcactgtcag tgtcacagat 120

gactggccaa agttacggaa gcaggaccgc actcgctgc ccaccaggct cttaacctca 180

aagagtttct tctctaaggc tgtgctggac atattcacct cccgctttac ttgtgcccag 240

acctttaact ttacccgagg tctctgcctg tacaaggact acacagctag aaaggacttt 300

gtggtctctg aagatgcatg gcattcagat aattacaaac acctcgatgc ctgtccaaac 360

cagcttacac ccatgaagga cttcctgtcc ttagtggatg gaggctttgc catcaactca 420

ccattccccac tgatcctgca gccgcagcgg gctgtggacc tcattgtgc ctgtactat 480

tccctggaaag cccctttga ggtcctgcag gtgacagaga agtactgccc ggaccgaggg 540

atccccttcc caaggattga ggtagacccc aaggactcta aggacccccc tgaatgctat 600

37/52

ctgtttactg aggccggagga cccctgctcg cccattgtgc tgcattttcc tc ttgtcaac 660

aggacaccttc gcaaacacct ggctccagga gtggaacgac aaacagctga ggagaaggcc 720

ttcggggact ttatcatcaa cgggccagat actgcctatg gaatgatgaa ct tcaccc tac 780

gag 783

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

acctcatttgat gtcctttgac 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

caagacgttg tatcggtca 20

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

38/52

<400> 30

tgtgctggac atattcacct c

21

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 31

aaggcttct cctcagctgt

20

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

ctaagaatcc tgatgtggag a

21

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33

cttgatcatc ccagcacaga

20

<210> 34

<211> 21

39/52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

acttctgctt gcagagaagt g

21

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35

caactctgag tagcagtcag t

21

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

cccatcacca tttccagga gc

22

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

40/52

<400> 37

ttcaccacct tcttgatgtc atcata 26

<210> 38

<211> 853

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Met Pro Trp Thr Leu Gln Pro Lys Trp Leu Ala Gly Lys Gly Leu Pro
1 5 10 15Leu Leu Gly Ala Ile Leu Leu Arg Lys Thr Glu Lys Ser Glu Pro Gln
20 25 30Trp Lys His Arg Arg Glu Thr His Pro Tyr Tyr Asp Leu Gln Val Lys
35 40 45Val Leu Arg Ala Arg Asn Ile Gln His Thr Asp Lys Leu Ser Lys Ala
50 55 60Asp Cys Tyr Val Arg Leu Trp Leu Pro Thr Ala Ser Val Ser Pro Ser
65 70 75 80Gln Thr Arg Thr Val Val Asn Ser Ser Asp Pro Glu Trp Asn Glu Thr
85 90 95Phe Pro Tyr Gln Ile His Gly Ala Val Lys Asn Val Leu Glu Leu Ala
100 105 110Leu Tyr Asp Glu Asp Val Leu Asp Ser Asp Asn Val Phe Ser Ile Leu
115 120 125Phe Asp Thr Ser Thr Leu Gln Leu Gly Gln Pro Cys Thr Lys Asn Phe
130 135 140

Thr Arg Gln Gln Asp Pro Lys Glu Leu Glu Val Glu Phe Thr Leu Glu

41/52

145 150 155 160

Lys Ser Gln Thr Pro Ala Ser Glu Val Val Thr Asn Gly Val Leu Val
165 170 175Ala His Pro Cys Leu Arg Ile Gln Gly Thr Val Thr Gly Asp Lys Thr
180 185 190Ala Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Arg Gln Ile Gln Leu Ala Val Pro
195 200 205Gly Ala Tyr Glu Lys Pro Gln Pro Leu Gln Pro Thr Ser Glu Pro Gly
210 215 220Leu Pro Val Asn Phe Thr Phe His Val Asn Pro Val Leu Ser Pro Lys
225 230 235 240Leu His Ile Lys Leu Gln Glu Gln Leu Gln Val Phe His Ser Gly Pro
245 250 255Ser Asp Glu Leu Glu Ala Gln Thr Ser Lys Met Asp Lys Ala Ser Ile
260 265 270Leu Leu Ser Ser Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Thr Lys Leu Val Asp
275 280 285Leu Glu Glu Gly Gln Gln Val Ser Leu Arg Met Lys Ala Asp Met Ser
290 295 300Ser Gly Asp Leu Asp Leu Arg Leu Gly Phe Asp Leu Cys Asp Gly Glu
305 310 315 320Gln Glu Phe Leu Asp Lys Arg Lys Gln Val Ala Ser Lys Ala Leu Gln
325 330 335Arg Val Met Gly Leu Ser Glu Ala Leu His Cys Asp Gln Val Pro Val
340 345 350

42/52

Val Ala Val Leu Gly Ser Gly Gly Thr Arg Ala Met Thr Ser Leu
355 360 365

Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Leu Gln Glu Leu Gly Leu Leu Asp Ala Val
370 375 380

Thr Tyr Leu Ser Gly Val Ser Gly Ser Ser Trp Cys Ile Ser Thr Leu
385 390 395 400

Tyr Arg Asp Pro Ser Trp Ser Gln Lys Ala Leu Gln Gly Pro Ile Lys
405 410 415

Tyr Ala Ser Glu Arg Val Cys Ser Ser Lys Ile Gly Met Leu Ser Pro
420 425 430

Lys Gln Phe Glu Tyr Tyr Ser Arg Glu Lys Arg Ala Trp Glu Ser Arg
435 440 445

Gly His Ser Met Ser Phe Thr Asp Leu Trp Gly Leu Ile Ile Glu Tyr
450 455 460

Phe Leu Asn Gln Glu Glu Asn Pro Ala Lys Leu Ser Asp Gln Gln Glu
465 470 475 480

Thr Val Ser Gln Gly Gln Asn Pro Tyr Pro Ile Tyr Ala Ser Ile Asn
485 490 495

Val His Lys Asn Ile Ser Gly Asp Asp Phe Ala Glu Trp Cys Glu Phe
500 505 510

Thr Pro Tyr Glu Val Gly Phe Pro Lys Tyr Gly Ala Tyr Val Pro Thr
515 520 525

Glu Leu Phe Gly Ser Glu Phe Phe Met Gly Arg Leu Leu His Phe Trp
530 535 540

Pro Glu Pro Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Gly Met Trp Gly Ser Ala Phe
545 550 555 560

43/52

Ala Ala Ser Leu Tyr Glu Ile Phe Leu Lys Leu Gly Gly Leu Ser Leu
565 570 575

Ser Phe Leu Asp Trp His Arg Gly Ser Val Ser Val Thr Asp Asp Trp
580 585 590

Pro Lys Leu Arg Lys Gln Asp Pro Thr Arg Leu Pro Thr Arg Leu Phe
595 600 605

Thr Pro Met Ser Ser Phe Ser Gln Ala Val Leu Asp Ile Phe Thr Ser
610 615 620

Arg Ile Thr Cys Ala Gln Thr Phe Asn Phe Thr Arg Gly Leu Cys Met
625 630 635 640

Tyr Lys Asp Tyr Thr Ala Arg Lys Asp Phe Val Val Ser Glu Asp Ala
645 650 655

Trp His Ser His Asn Tyr Gly Tyr Pro Asp Ala Cys Pro Asn Gln Leu
660 665 670

Thr Pro Met Lys Asp Phe Leu Ser Leu Val Asp Gly Gly Phe Ala Ile
675 680 685

Asn Ser Pro Phe Pro Leu Val Leu Gln Pro Gln Arg Ala Val Asp Leu
690 695 700

Ile Val Ser Phe Asp Tyr Ser Leu Glu Gly Pro Phe Glu Val Leu Gln
705 710 715 720

Val Thr Glu Lys Tyr Cys Arg Asp Arg Gly Ile Pro Phe Pro Arg Ile
725 730 735

Glu Val Asp Pro Lys Asp Ser Glu Asp Pro Arg Glu Cys Tyr Leu Phe
740 745 750

Ala Glu Ala Glu Asp Pro Cys Ser Pro Ile Val Leu His Phe Pro Leu

44/52

755	760	765
Val Asn Arg Thr Phe Arg Thr His Leu Ala Pro Gly Val Glu Arg Gln		
770	775	780
Thr Ala Glu Glu Lys Ala Phe Gly Asp Phe Ile Ile Asn Gly Pro Asp		
785	790	795
800		
Thr Ala Tyr Gly Met Met Asp Phe Thr Tyr Glu Pro Lys Glu Phe Asp		
805	810	815
Arg Leu Val Thr Leu Ser Arg Tyr Asn Val Leu Asn Asn Lys Glu Thr		
820	825	830
Ile Arg His Ala Leu Gln Leu Ala Leu Asp Arg Arg Arg Gln Ala Gly		
835	840	845
Gly Arg Val Gly Gly		
850		

<210> 39
<211> 2694
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (52)...(2610)

<400> 39
tctggaaac aggcaagctc cctactggga cctgagctgc tactgctggc c atg ccc 57
Met Pro
1

tgg act ctc cag cca aag tgg ctg gca ggc aag gga ctt ccc ctt ctt 105
Trp Thr Leu Gln Pro Lys Trp Leu Ala Gly Lys Gly Leu Pro Leu Leu

45/52

5

10

15

gga gcc ata ctg cta cgg aag aca gaa aag agc gaa cca caa tgg aag 153
 Gly Ala Ile Leu Leu Arg Lys Thr Glu Lys Ser Glu Pro Gln Trp Lys
 20 25 30

cat agg cgg gaa acc cac cca tac tac gac ctt caa gtg aag gtg ctg 201
 His Arg Arg Glu Thr His Pro Tyr Tyr Asp Leu Gln Val Lys Val Leu
 35 40 45 50

agg gcc aga aac atc cag cac aca gat aag ttg tcc aaa gcc gac tgc 249
 Arg Ala Arg Asn Ile Gln His Thr Asp Lys Leu Ser Lys Ala Asp Cys
 55 60 65

tat gtt cga ctg tgg ctg ccc acg gct tct gtt agc ccc agt cag aca 297
 Tyr Val Arg Leu Trp Leu Pro Thr Ala Ser Val Ser Pro Ser Gln Thr
 70 75 80

agg aca gtg gtt aac agc agt gat cca gaa tgg aat gag acc ttt ccc 345
 Arg Thr Val Val Asn Ser Ser Asp Pro Glu Trp Asn Glu Thr Phe Pro
 85 90 95

tat cag atc cac ggc gct gtg aag aac gtc ctg gag ctt gcc ctt tat 393
 Tyr Gln Ile His Gly Ala Val Lys Asn Val Leu Glu Leu Ala Leu Tyr
 100 105 110

gac gag gat gtc ctg gac agt gac aat gtc ttc tcc att ctg ttt gac 441
 Asp Glu Asp Val Leu Asp Ser Asp Asn Val Phe Ser Ile Leu Phe Asp
 115 120 125 130

acg agt act ctt cag cta ggc cag cct tgc aca aaa aac ttc acc agg 489
 Thr Ser Thr Leu Gln Leu Gly Gln Pro Cys Thr Lys Asn Phe Thr Arg
 135 140 145

cag cag gat cca aaa gag ctg gaa gta gaa ttt act ctg gaa aag agt 537
 Gln Gln Asp Pro Lys Glu Leu Glu Val Glu Phe Thr Leu Glu Lys Ser
 150 155 160

46/52

cag acg cct gca tct gaa gtt gtc acc aat ggt gtc ctg gtg gct cac			585
Gln Thr Pro Ala Ser Glu Val Val Thr Asn Gly Val Leu Val Ala His			
165	170	175	
ccc tgt ctg aga att cag ggc aca gtc act gga gac aag aca gcc tcc			633
Pro Cys Leu Arg Ile Gln Gly Thr Val Thr Gly Asp Lys Thr Ala Ser			
180	185	190	
ctt gga gag ttg ggc tcc agg cag atc cag ctg gca gtg cct ggg gcc			681
Leu Gly Glu Leu Gly Ser Arg Gln Ile Gln Leu Ala Val Pro Gly Ala			
195	200	205	210
tat gaa aag cca cag cct ctg cag cca acc tcg gag cca ggc ctc cca			729
Tyr Glu Lys Pro Gln Pro Leu Gln Pro Thr Ser Glu Pro Gly Leu Pro			
215	220	225	
gtg aac ttt acc ttc cac gtg aac cca gtg ctg agc ccc aag ctg cac			777
Val Asn Phe Thr Phe His Val Asn Pro Val Leu Ser Pro Lys Leu His			
230	235	240	
ata aag ctg caa gaa cag ctc caa gtc ttc cat agt ggc ccg agt gat			825
Ile Lys Leu Gln Glu Gln Leu Gln Val Phe His Ser Gly Pro Ser Asp			
245	250	255	
gag ctg gaa gct cag acc agc aag atg gac aag gca agc atc ctg ctc			873
Glu Leu Glu Ala Gln Thr Ser Lys Met Asp Lys Ala Ser Ile Leu Leu			
260	265	270	
tcc tct ctg ccc ctc aac gag gag tta acg aaa ctt gtg gac ctg gag			921
Ser Ser Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Thr Lys Leu Val Asp Leu Glu			
275	280	285	290
gag ggc cag cag gtg tct ctt agg atg aag gca gac atg agc tct ggg			969
Glu Gly Gln Gln Val Ser Leu Arg Met Lys Ala Asp Met Ser Ser Gly			
295	300	305	
gac ttg gac ctg cgc ctt ggt ttt gac ctc tgt gat gga gag cag gaa			1017
Asp Leu Asp Leu Arg Leu Gly Phe Asp Leu Cys Asp Gly Glu Gln Glu			

47/52

310	315	320
-----	-----	-----

ttt ctg gac aag agg aag cag gtg gcg tcc aag gcc ctg cag cgg gtg Phe Leu Asp Lys Arg Lys Gln Val Ala Ser Lys Ala Leu Gln Arg Val	1065	
325	330	335

atg gga ttg agt gag gct ctg cac tgt gac cag gta cct gtg gta gcc Met Gly Leu Ser Glu Ala Leu His Cys Asp Gln Val Pro Val Val Ala	1113	
340	345	350

gtg tta ggc tct ggg ggt gga acc aga gcc atg act tcc ctg tac ggc Val Leu Gly Ser Gly Gly Thr Arg Ala Met Thr Ser Leu Tyr Gly	1161		
355	360	365	370

agc ctg gct ggg ctg cag gag ctt ggt ctt ctg gat gcc gtg acc tac Ser Leu Ala Gly Leu Gln Glu Leu Gly Leu Leu Asp Ala Val Thr Tyr	1209	
375	380	385

ctg agt ggg gtc tct ggg tct tcc tgg tgc atc tct aca ctc tac agg Leu Ser Gly Val Ser Gly Ser Ser Trp Cys Ile Ser Thr Leu Tyr Arg	1257	
390	395	400

gat cca tcc tgg tcc cag aag gct ttg cag ggc ccc att aaa tat gcc Asp Pro Ser Trp Ser Gln Lys Ala Leu Gln Gly Pro Ile Lys Tyr Ala	1305	
405	410	415

tca gag cga gtc tgc agc agt aaa att ggg atg ctg tcc cca aag cag Ser Glu Arg Val Cys Ser Ser Lys Ile Gly Met Leu Ser Pro Lys Gln	1353	
420	425	430

ttt gaa tac tac tcc cgg gaa aag aga gcc tgg gag agc agg gga cac Phe Glu Tyr Tyr Ser Arg Glu Lys Arg Ala Trp Glu Ser Arg Gly His	1401		
435	440	445	450

agc atg tcc ttc act gac ttg tgg ggc ctc atc att gag tat ttc ctg Ser Met Ser Phe Thr Asp Leu Trp Gly Leu Ile Ile Glu Tyr Phe Leu	1449	
455	460	465

48/52

aac cag gag gaa aac cct gcc aag ctg tca gac cag caa gaa acg gtc			1497
Asn Gln Glu Glu Asn Pro Ala Lys Leu Ser Asp Gln Gln Glu Thr Val			
470	475	480	
agc cag ggt cag aac cca tac ccc atc tat gcc agc att aat gtc cac			1545
Ser Gln Gly Gln Asn Pro Tyr Pro Ile Tyr Ala Ser Ile Asn Val His			
485	490	495	
aaa aac atc agt ggg gac gac ttt gca gag tgg tgc gag ttc acc ccc			1593
Lys Asn Ile Ser Gly Asp Asp Phe Ala Glu Trp Cys Glu Phe Thr Pro			
500	505	510	
tat gag gtc ggt ttc ccc aag tac ggg gct tac gtt ccc acg gaa ctc			1641
Tyr Glu Val Gly Phe Pro Lys Tyr Gly Ala Tyr Val Pro Thr Glu Leu			
515	520	525	530
ttt ggc tct gaa ttc ttc atg ggc cgg ctg ctg cat ttc tgg cca gag			1689
Phe Gly Ser Glu Phe Phe Met Gly Arg Leu Leu His Phe Trp Pro Glu			
535	540	545	
ccc cgc atc tgt tac ctg cag ggt atg tgg gga agt gct ttt gca gcc			1737
Pro Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Gly Met Trp Gly Ser Ala Phe Ala Ala			
550	555	560	
agc ctg tat gag atc ttc ctg aag ctg gga ggc cta agc ctg agc ttt			1785
Ser Leu Tyr Glu Ile Phe Leu Lys Leu Gly Gly Leu Ser Leu Ser Phe			
565	570	575	
ctg gac tgg cac agg ggg agt gtc agt gtc aca gat gac tgg cca aag			1833
Leu Asp Trp His Arg Gly Ser Val Ser Val Thr Asp Asp Trp Pro Lys			
580	585	590	
tta cgg aag cag gac ccc aca cgg ctg cct acc aga ctc ttc acg cca			1881
Leu Arg Lys Gln Asp Pro Thr Arg Leu Pro Thr Arg Leu Phe Thr Pro			
595	600	605	610
atg agt tcc ttc tct cag gct gtg ctg gac ata ttc acc tcc cgt att			1929
Met Ser Ser Phe Ser Gln Ala Val Leu Asp Ile Phe Thr Ser Arg Ile			

49/52

615

620

625

act tgt gcc cag acc ttt aac ttt acc cga ggt ctc tgc atg tac aaa 1977
 Thr Cys Ala Gln Thr Phe Asn Phe Thr Arg Gly Leu Cys Met Tyr Lys
 630 635 640

gac tac aca gct aga aag gac ttc gtg gtc tct gaa gat gca tgg cat 2025
 Asp Tyr Thr Ala Arg Lys Asp Phe Val Val Ser Glu Asp Ala Trp His
 645 650 655

tca cat aac tat gga tac cct gat gcc tgt ccc aac cag ctc aca ccc 2073
 Ser His Asn Tyr Gly Tyr Pro Asp Ala Cys Pro Asn Gln Leu Thr Pro
 660 665 670

atg aag gac ttc ctg tcc cta gta gat gga ggc ttt gct atc aac tcg 2121
 Met Lys Asp Phe Leu Ser Leu Val Asp Gly Gly Phe Ala Ile Asn Ser
 675 680 685 690

cca ttt cca ctg gtc ctg cag ccg cag cgg gct gtg gac ctc att gtg 2169
 Pro Phe Pro Leu Val Leu Gln Pro Gln Arg Ala Val Asp Leu Ile Val
 695 700 705

tcc ttt gac tat tcc ttg gaa ggc cct ttt gag gtc ctg cag gtg aca 2217
 Ser Phe Asp Tyr Ser Leu Glu Gly Pro Phe Glu Val Leu Gln Val Thr
 710 715 720

gag aag tac tgc cgg gac cga ggg atc ccc ttc cca agg att gag gtg 2265
 Glu Lys Tyr Cys Arg Asp Arg Gly Ile Pro Phe Pro Arg Ile Glu Val
 725 730 735

gac ccc aag gac tct gaa gac ccc cgt gaa tgc tat ctg ttt gct gag 2313
 Asp Pro Lys Asp Ser Glu Asp Pro Arg Glu Cys Tyr Leu Phe Ala Glu
 740 745 750

gca gag gac ccc tgc tcg ccc atc gtg ctg cat ttc cct ctt gtc aac 2361
 Ala Glu Asp Pro Cys Ser Pro Ile Val Leu His Phe Pro Leu Val Asn
 755 760 765 770

50/52

agg acc ttt cgc acg cac ctg gcc cca ggt gtg gaa cga caa aca gct 2409
Arg Thr Phe Arg Thr His Leu Ala Pro Gly Val Glu Arg Gln Thr Ala
775 780 785

gag gag aag gcc ttc ggg gac ttt atc atc aac ggg cca gat act gcc 2457
Glu Glu Lys Ala Phe Gly Asp Phe Ile Ile Asn Gly Pro Asp Thr Ala
790 795 800

tat ggc atg atg gat ttc acc tac gag ccc aag gaa ttt gat cggt ctg 2505
Tyr Gly Met Met Asp Phe Thr Tyr Glu Pro Lys Glu Phe Asp Arg Leu
805 810 815

gtg acc ctg agc cga tac aac gtc ttg aac aac aag gag act atc agg 2553
Val Thr Leu Ser Arg Tyr Asn Val Leu Asn Asn Lys Glu Thr Ile Arg
820 825 830

cat gcc ctc cag ctg gct ctg gac cgg cgg cgg cag gct ggg gga agg 2601
His Ala Leu Gln Leu Ala Leu Asp Arg Arg Arg Gln Ala Gly Gly Arg
835 840 845 850

gtt ggg ggc tgatcacatg agagtcagag gactgtggtg gtgtgatgga 2650
Val Gly Gly

ggaccttaag tcagagtatg ctgagggaga ggaaagactt taaa 2694

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

tctggaaac aggcaagctc 20

<210> 41

<211> 20

51/52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41

tcctggttca ggaaatactc

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

tggttttgac ctctgtgatg

20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43

tgtaaggaca gctggttcct

20

<210> 44

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

52/52

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 44

gccaccatgg actacaagga cgatgacgac aagtggctgg caggcaagg 49

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 45

gtacctggtc acagtgcaga 20

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 46

atcccttcat actgagacct c 21

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 47

tccagttgtc atggattgc a 21

出願人又は代理人の書類記号 1340	国際出願番号 PCT/JP01/08138
-----------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示
 [PCT規則13の2]

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

15 頁、 9 行

B. 寄託の表示	他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）	
日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 25.08.00	受託番号 F E R M B P - 7281
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）	この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>
ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の提出（該当しない場合には記載しない）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄

この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員
仲村和雄

国際事務局記入欄

この用紙が国際事務局に受理された日
05 OCT 2001

権限のある職員
窪進

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08138

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N15/55, C12N9/16, C12N5/10, C12N1/21, C12Q1/68, C07K16/40, G01N33/573, G01N33/50, G01N33/15, A61K38/46, A61K31/711, A61K39/395, A61P11/06, A61P9/10, A61P19/02, A61P39/00, A61P7/00, A61P17/00, A61P25/16, A61P5/38, A61P25/28, A61P35/00, A61P13/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/55, C12N9/16, C12N5/10, C12N1/21, C12Q1/68, C07K16/40, G01N33/573, G01N33/50, G01N33/15, A61K38/46, A61K31/711, A61K39/395, A61P11/06, A61P9/10, A61P19/02, A61P39/00, A61P7/00, A61P17/00, A61P25/16, A61P5/38, A61P25/28, A61P35/00, A61P13/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN),
EMBL/DDBJ/Genebank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6025178 A (Lilly & Co. Eli), 15 February, 2000 (15.02.00), (Family: none)	1-35, 37-57
A	WO 00/24911 A2 (Incyte Pharm. Inc.), 04 May, 2000 (04.06.00), & AU 200014516 A & EP 1131445 A1	1-35, 37-57
A	WO 00/47763 A1 (Genetics Inst. Inc.), 17 August, 2000 (17.08.00), & AU 200029937 A	1-35, 37-57

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 October, 2001 (15.10.01)

Date of mailing of the international search report
23 October, 2001 (23.10.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08138

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 36
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the compounds obtained by the screening method as set forth in claim 36, it is completely unknown what particular compounds are involved in the scope thereof and what are not. Thus, the above claim is described in an extremely unclear manner. Such being the case, no meaningful opinion can be made on the novelty, inventive step and industrial applicability of the invention as set forth in the above claim.
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1⁷ C12N15/55, C12N9/16, C12N5/10, C12N1/21, C12Q1/68, C07K16/40, G01N33/573, G01N33/50, G01N33/15, A61K38/46, A61K31/711, A61K39/395, A61P11/06, A61P9/10, A61P19/02, A61P39/00, A61P7/00, A61P17/00, A61P25/16, A61P5/38 A61P25/28, A61P35/00, A61P13/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1⁷ C12N15/55, C12N9/16, C12N5/10, C12N1/21, C12Q1/68, C07K16/40, G01N33/573, G01N33/50, G01N33/15, A61K38/46, A61K31/711, A61K39/395, A61P11/06, A61P9/10, A61P19/02, A61P39/00, A61P7/00, A61P17/00, A61P25/16, A61P5/38 A61P25/28, A61P35/00, A61P13/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)
 JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),
 MEDLINE(STN),
 EMBL/DDBJ/Genebank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 6025178 A (LILLY & CO. ELI) 15. 2月. 2000 (15. 02. 00) (ファミリーなし)	1-35, 37-57
A	WO 00/24911 A2 (INCYTE PHARM INC.) 4. 5月. 2000 (04. 05. 00) &AU 200014516 A &EP 1131445 A1	1-35, 37-57
A	WO 00/47763 A1 (GENETICS INST INC.) 17. 8月. 2000 (17. 08. 00) &AU 200029937 A	1-35, 37-57

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 15. 10. 01	国際調査報告の発送日 23.10.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 上條 肇 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 9453

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

2. 請求の範囲 36 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

請求の範囲 36 に記載のスクリーニング方法により得られる化合物については、化合物として具体的にどのような化合物が含まれ、どのような化合物が含まれないのかが全く不明であって、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲に記載された発明に係る新規性、進歩性、産業上の利用可能性についての有意義な見解を示すことができない。

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。